

Untersuchungen zur Funktionalität genetisch veränderter Spender-T-Zellen in der adaptiven Immuntherapie für pädiatrische Patienten mit Leukämien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Gabriele Hollatz
aus Bremen

Frankfurt 2007
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Kreuter

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Klingebiel

Datum der Disputation: 12. November 2007

Was gesucht wird, wird gefunden.
Sophokles

Meinem verstorbenen Vater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	11
1.1 Krebserkrankungen im Kindesalter	12
1.1.1 Leukämien	13
1.1.2 Klassische Therapieelemente.....	13
1.2 Knochenmark- und Stammzelltransplantation	15
1.2.1 Spenderauswahl und HLA-Kompatibilität	18
1.2.2 Immunologische Spender-Empfänger-Reaktionen.....	20
1.2.3 Die Vorbereitung des Patienten auf die allogene Stammzelltransplantation....	23
1.2.4 Die Phase nach der Transplantation	24
1.3 Adaptive Immuntherapie	25
1.3.1 T-Zellen (Donor-Lymphozyten-Infusion)	25
1.3.2 Natürliche Killer-Zellen.....	26
1.3.3 Dendritische Zellen.....	27
1.4 Gentherapie	28
1.4.1 Methoden des Gentransfers	28
1.4.2 Gamma-Retrovirale Vektoren.....	29
1.4.3 Risiken des retroviralen Gentransfers.....	33
1.5 DLI mit Suizidgen tragenden T-Zellen	34
1.5.1 Der Wirkmechanismus des Suizidgen Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus.....	36
2. Zielsetzung dieser Arbeit	37
3. Material und Methoden.....	39
3.1 Materialien.....	39
3.1.1 Geräte.....	39
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	40
3.1.3 Chemikalien, Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	40
3.1.4 Antikörper und andere Materialien für die Durchflusszytometrie	40
3.2 Methoden	43
3.2.1 Ficoll-Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen	43
3.2.2 Isolierung primärer humaner T-Zellen im Labormaßstab	44
3.2.3 Isolierung primärer humaner T-Zellen im klinischen Maßstab.....	45
3.2.4 Einfrieren und Auftauen von CD3 ⁺ T-Zellen in Beuteln.....	46
3.2.5 Aktivierung und Expansion primärer humaner T-Zellen	47
3.2.6 Durchflusszytometrische Messungen	49
3.2.7 Untersuchung der Zytokinausschüttung unter Stimulierung mittels Cytometric Bead Array	55
3.2.8 Transduktion primärer humaner T-Zellen	57

4. Ergebnisse	59
4.1 Isolierung primärer humaner T-Zellen	59
4.1.1 Selektion der CD3 ⁺ T-Zellen im Labormaßstab	59
4.1.2 Selektion der CD3 ⁺ T-Zellen im klinischen Maßstab.....	59
4.2 Aktivierung und Expansion primärer humaner T-Zellen	62
4.2.2 Aktivierung primärer humaner T-Zellen mittels löslicher Antikörper und IL-2	63
4.2.3 Aktivierung primärer humaner T-Zellen mittels auf Beads gekoppelter Antikörper und IL-2.....	66
4.2.4 Die Vitalität und Expansion primärer humaner T-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsprotokollen.....	67
4.2.5 Expansion und Vitalität selektierter CD3 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu mononukleären Zellen unter Aktivierung.....	69
4.2.6 Expansionsrate und Vitalität von frisch aufgetauten T-Zellen.....	71
4.2.7 Expansion und Vitalität in der Zellkulturflasche und im Beutel	72
4.3 Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen unter Stimulierung.....	75
4.4 Einfluss der Aktivierung auf den Immunstatus primärer humaner T-Zellen.....	76
4.5 Verteilung der T-Zellsubpopulationen vor und nach Transduktion mit dem retroviralen HSV-TK/CD34 Vektor.....	83
4.6 Expansion CMV-spezifischer T-Zellen nach Aktivierung und nach Transduktion	86
4.7 Zytokinausschüttung unter Stimulierung.....	88
5. Diskussion	93
5.1 Isolierung und Expansion primärer humaner T-Zellen.....	94
5.2 Der immunologische Phänotyp der expandierten und transduzierten T-Zellen	98
5.3 Antigenspezifische T-Zellen und Zytokinausschüttung	101
5.4 Die Funktionalität aktivierter und transduzierter T-Zellen	102
6. Ausblick.....	107
7. Zusammenfassung.....	109
Literaturverzeichnis.....	113
Anhang	123

Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>activation induced cell death</i>	Zelltod durch Stimulierung bei T-Zellen
ALL	Akute lymphatische Leukämie	
AML	Akute myeloische Leukämie	
APC	<i>antigen presenting cell</i>	Antigen präsentierende Zelle
B-ALL	B-Zellleukämie	
BFM	„Berlin-Frankfurt-Münster“	Name von Studienprotokollen für Kinder
BSD	Blutspendedienst	
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Nomenklatur für Oberflächenantigene
cDNA	<i>copy DNA</i>	kopierte DNA
CFU	<i>colony forming unit(s)</i>	determinierte Stammzellen
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie	
CML	Chronisch myeloische Leukämie	
CMV	Cytomegalovirus	
DC	<i>dendritic cell</i>	Dendritische Zelle
DFS	<i>disease free survival</i>	krankheitsfreie Überleben
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i>	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i>	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus	
ECD	Phycoerythrin-Texas Rot	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
env	<i>envelope</i>	Hüllprotein des Retrovirus
EPO	Erythropoietin	
FFP	<i>fresh frozen plasma</i>	in Quarantäne getestetes, frisch eingefrorenes humanes Plasma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	
FS	<i>forward scatter</i>	ein ungefähres Maß für die Zellgröße im Durchflusszytometer
g	Erdbeschleunigung	
g	Gramm	
gag	<i>group-specific antigen</i>	gruppenspezifisches Antigen
GALV	<i>gibbon ape leukemia virus</i>	Einfaches Retrovirus
G-CSF	<i>granulocyte stimulating factor</i>	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GMP	<i>good manufacturing practice</i>	Gute Herstellungspraxis
GVHD	<i>graft-versus-host disease</i>	„Transplantat-gegen-Wirt“-Erkrankung
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>	Transplantat-gegen-Leukämie
HR	Hoch-Risiko	
h	Stunde	
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>	humane Leukozytenantigene
HP	Humanes Plasma (FFP)	
HSA	Humanes Serum Albumin	
HSV	Herpes-Simplex-Virus	
ICD	<i>international classification of diseases</i>	Internationales Klassifizierungssystem für Krankheiten der WHO
IFN- γ	Interferon-gamma	
IL-2	Interleukin-2	

kDa	kilo Dalton	Gewichtseinheit für Proteine
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>	NK-Zellrezeptor
KM	Knochenmark	
l	Liter	
LNFRG	<i>low affinity nerve growth factor- receptor</i>	transmembranärer Rezeptor
LTR	<i>long terminal repeat</i>	virale Promotorsequenz
M	Molar	
mAb	<i>monoclonal antibody</i>	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>	immunomagnetische Selektion
mHA	<i>minor histocompatibility complex</i>	minor Histokompatibilitätsantigene
MFD	<i>matched family donor</i>	identer verwandter Spender
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute	
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>	Gemischte-Lymphozyten-Reaktion
MMRD	<i>mismatched related donor</i>	nicht-identer verwandter Spender
MMUD	<i>mismatched unrelated donor</i>	nicht-identer Fremdspender
MNZ	mononukleäre Zellen	
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	Verhältnis Virus/Zellen
MPSV	<i>murine proliferating sarcoma virus</i>	Einfaches Retrovirus
MRD	<i>minimal residual disease</i>	minimale Resterkrankung
MUD	<i>matched unrelated donor</i>	identer Fremdspender
NIH	<i>National Institutes of Health</i>	Nationale Gesundheitsinstitute der USA
NK	natürliche Killer(zelle)	
NS	Nervensystem	
PBS	<i>primer binding site</i>	Primerbindungsstelle
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung
PBSC	<i>peripheral blood stem cells</i>	mobilierte periphere Stammzellen
p.i.	per infusionem	
PE	Phycoerythrin	
PC-5	Phycoerythrin-Cyanine 5	
PC-7	Phycoerythrin-Cyanine 7	
PHA	Phythämagglutinin A	
pol	retrovirales Gen, das die Proteine Reverse Transkriptase und Integrase codiert	
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur	
sa	Spleiß-Akzeptor	
SCF	<i>stem cell factor</i>	Stammzellfaktor
sd	Spleiß-Donor	
SD	<i>standard deviation</i>	Standardabweichung
SS	<i>side scatter</i>	ein ungefähres Maß für die Granularität der Zelle im Durchflusszytometer
s.c.	subkutan	unter die Haut
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>	Einfaches Retrovirus
SZT	Stammzelltransplantation	
TCR	<i>T-cell receptor</i>	T-Zellrezeptor

TF	Transkriptionsfaktor	
TK	Thymidinkinase	
TK39	Ganciclovir hypersensitive Mutante der TK	
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha	
TPO	Thrombopoietin	
T-reg	Regulatorische T-Zellen	
U	<i>unit</i>	Einheit
vs.	versus	
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Weltgesundheitsorganisation
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>	virale Sequenz zur Erhöhung der Expression des Transgens
X-SCID	<i>X-linked combined immunodeficiency syndrome</i>	Schwerer Immundefekt
ZNS	Zentrales Nervensystem	

Rechtschreibung

Die Neuregelung der deutschen Rechtschreibung ist am 6. August 2006 in Kraft getreten. Die vorliegende Arbeit entspricht diesen neuen Regeln sowie den Empfehlungen aus der 24. Auflage des Rechtschreiblexikons.

1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem lässt sich unterscheiden in eine humorale und zelluläre Abwehr. T-Zellen gehören zur zellulären Abwehr und stellen einen wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort gegenüber Pathogenen dar. Außerdem hat sich gezeigt, dass diese Zellen eine besondere Rolle in der Bekämpfung von Krebserkrankungen spielen; die T-Zellen eines Patienten und insbesondere die eines gesunden fremden Spenders sind in der Lage, Leukämie- und Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Vor diesem Hintergrund wurde die adaptive Immuntherapie entwickelt, bei der dem Patienten nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation zusätzlich Donor-Lymphozyten – hauptsächlich bestehend aus T-Zellen – verabreicht werden, um das Wiederauftreten von malignen Zellen frühzeitig zu verhindern. Dieser Einsatz von T-Zellen zur Bekämpfung von Krebs erfolgt bisher zumeist unselektiv, nach entsprechender Vorbereitung können T-Zellen aber auch selektiv gegen bestimmte Antigene eingesetzt werden. Der unselektive Einsatz hat den Vorteil eines großen Wirkspektrums gegenüber Pathogenen und entarteten Zellen. Doch dieser Vorteil wird durch das Risiko einer Zerstörung gesunden Gewebes erkaufte. Mit dem Ziel, dieses Risiko zu kontrollieren, können die T-Zellen genetisch unter Verwendung von Suizidgenen verändert werden. Suizidgen transduzierte T-Zellen stellen ein neues Therapiekonzept in der adaptiven Immuntherapie dar und wurden bislang nur bei hämatologischen malignen Erkrankungen angewendet. Die Anwendung kann jedoch auch auf andere Krebserkrankungen ausgeweitet werden.

Unter dem Begriff „Krebs“ werden bösartige Neubildungen zusammengefasst. Diese Neubildungen resultieren aus einem gestörten Gleichgewicht zwischen Zellreplikation und programmiertem Zelltod. Um das Gleichgewicht zu stören, müssen meist Genmutationen über mehrere Zellgenerationen kumulieren. Eine Neubildung ist nicht immer bösartig; der Grad der Malignität richtet sich vielmehr nach folgenden Kriterien: Unkontrolliertes, ständiges Wachstum, Infiltration in andere Gewebe bzw. deren Verdrängung und Zerstörung sowie die Bildung von Metastasen. Ist keines dieser Kriterien erfüllt, handelt es sich um eine gutartige Neubildung.

1.1 Krebserkrankungen im Kindesalter

Die Häufigkeit bestimmter Krebserkrankungen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Patientenkollektiven wie Erwachsenen (> 24 Jahre alt), junge Erwachsenen (20-24 Jahre), Heranwachsenden (15-19 Jahre) und Kindern (0-14 Jahre) stark (Bleyer 2002). Dem Deutschen Kinderkrebsregister wurden zwischen 1980 und 2003 35.367 Kinder mit der Diagnose Krebs gemeldet. Dies ergibt eine jährliche Inzidenz von 14 Fällen pro 100.000 Kinder. Die häufigsten bösartigen Neubildungen im Kindesalter sind Leukämien, maligne Lymphome und Tumore des Zentralnervensystems (ZNS).

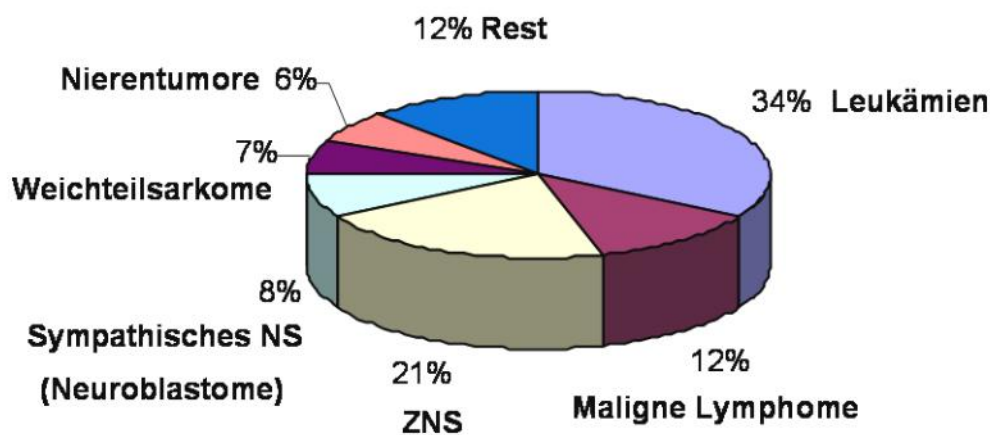


Abbildung 1.1 Krebserkrankungen im Kindesalter. Relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten (n=17.890) nach den häufigsten Diagnosegruppen (1994-2003). Quelle: Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2004. ZNS=Zentrales Nervensystem, NS=Nervensystem.

1.1.1 Leukämien

Leukämien sind maligne Erkrankungen des Knochenmarks und stellen ca. $\frac{1}{3}$ aller Krebserkrankungen im Kindesalter (Lightfoot 2005). Sie lassen sich in die akute und chronische Form unterteilen. Als Unterscheidungsmerkmal gilt, dass bei den akuten Leukämien der Differenzierungsgrad gering und die Zellteilungsrate hoch ist. Im Gegensatz dazu ist bei den chronischen Leukämien der Differenzierungsgrad hoch, aber die Teilungsrate niedrig. Zur weiteren Unterscheidung zieht man die Herkunft der klonalen Entartung heran. Daraus ergibt sich eine übergeordnete Klassifizierung in:

Akute	lymphatische	Leukämie	ALL
	myeloische	Leukämie	AML
Chronische	lymphatische	Leukämie	CLL
	myeloische	Leukämie	CML

Im Kindes- und Jugendalter treten fast ausschließlich akute Leukämien auf, von denen die ALL mit 80% die häufigste Form ist. Chronische Leukämien hingegen sind sehr selten. Zusammen mit der Weiterentwicklung der diagnostischen Möglichkeiten wurden auch weitere Klassifizierungssysteme entwickelt, die auf morphologischen, immunologischen und zytogenetischen Kriterien beruhen (Coebergh, *et al.* 2006).

1.1.2 Klassische Therapieelemente

Zu den klassischen Therapieelementen zur Bekämpfung von Krebserkrankungen gehören die Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie. Während die Chirurgie nur bei soliden Tumoren angewendet werden kann, sind die Chemo- und Strahlentherapie auch zur Bekämpfung von malignen hämatologischen Erkrankungen wie den Leukämien geeignet. Die Strahlentherapie wird meist als Lokaltherapie eingesetzt, auch wenn sie nicht so selektiv wirkt, dass gesundes Gewebe unverletzt bleibt. Dennoch ist die Schädigung des gesunden Gewebes geringer, da das Tumorgewebe empfindlicher auf die Strahlen reagiert. Die höchste Strahlenempfindlichkeit besteht während des Zellteilungszyklus in der Mitose und der frühen

S-Phase. Die Zellen des gesunden Gewebes befinden sich jedoch meist in der G_0 -Phase, der Ruhephase.

Die Chemotherapie mit Zytostatika wird meist systemisch appliziert und wirkt damit auf alle proliferierenden Zellen im Organismus. Daraus ergibt sich auch ein Teil des Spektrums an Nebenwirkungen: Aplasie (Knochenmark), Mukositis (Schleimhaut) und Alopezie (Haarzellen). Alternativ können Zytostatika regional intraarteriell infundiert werden, so dass nur das Tumorgewebe perfundiert wird. Bei Tumoren des zentralen Nervensystems spielt die Chemotherapie eine untergeordnete Rolle, da die Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich verhindert, dass ausreichende Konzentrationen erreicht werden.

1.2 Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Zu den jüngeren Therapieelementen zählen die Knochenmark- und Stammzelltransplantation, die v.a. bei Leukämien eingesetzt werden. Mit den Stammzellen sind pluripotente Stammzellen gemeint, von denen die im Knochenmark stattfindende Hämatopoese ausgeht (Abbildung 1.2).

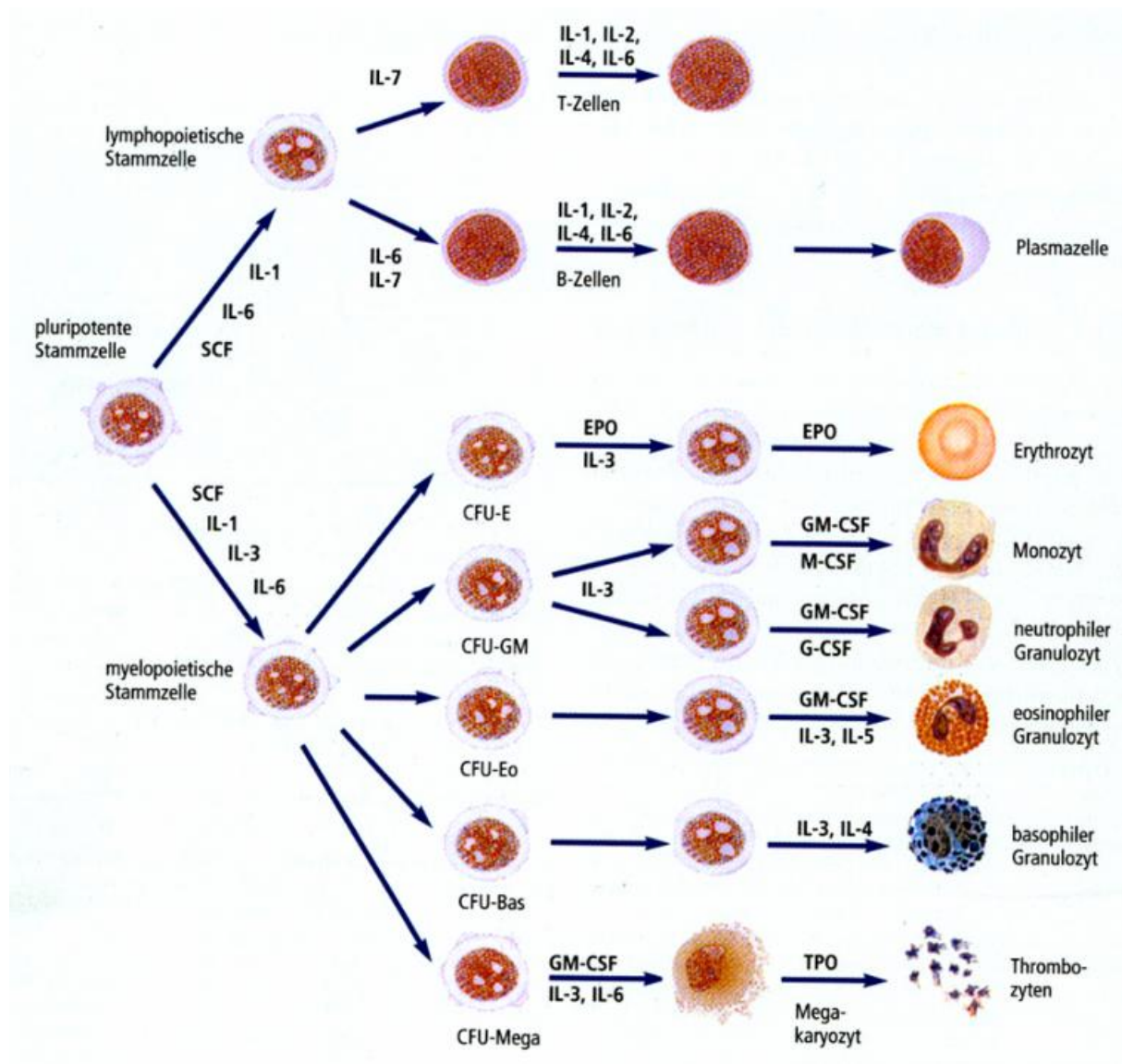


Abbildung 1.2 Hämatopoese aus einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark. Über den Pfeilen sind einige der an der Differenzierung mitwirkenden Wachstumsfaktoren und Zytokine dargestellt. IL = Interleukine, SCF = *stem cell factor* (Stammzellfaktor), CSF = *colony stimulating factor* (koloniestimulierender Faktor), EPO = Erythropoietin, TPO = Thrombopoietin. CFU (= *colony forming units*) stellen determinierte Stammzellen dar.

Aus den hämatopoetischen Stammzellen entwickelt sich eine lymphatische und eine myeloische Zellreihe. Aus der lymphatischen Stammzelle differenzieren sich über Vorläuferzellen die B- und T-Zellen, während aus der myeloischen Zellreihe die übrigen Blutzellen entstehen. Ein komplexes Wechselspiel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert die Hämatopoese.

Immunologisch werden die Stammzellen über das CD34 Oberflächenantigen, einem 115 kDa schwerem transmembranärem Glykoprotein, identifiziert. Dieses Antigen wird allgemein als Marker für hämatopoetische Stammzellen verwendet (Watt, *et al.* 1987). Die Gewinnung erfolgt zum einem aus dem Knochenmark (KM). Alternativ kann dem Spender auch der rekombinante hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF (*granulocyte colony stimlating factor*) s.c. gegeben werden (täglich über 4-5 Tage). Dadurch werden die Stammzellen mobilisiert und ins periphere Blut ausgeschüttet. Über eine Apherese werden die peripheren Stammzellen (*peripheral blood stem cells*; PBSC) gewonnen.

Das Knochenmarkaspirat wird dem Patienten in den meisten Fällen unselektiert appliziert, während das PBSC bei vielen Indikationen über das CD34 Oberflächenmolekül immunomagnetisch aufgereinigt wird, um unerwünschte Zellpopulationen, v.a. T-Zellen, zu entfernen. Die Konzentration der Stammzellen und T-Zellen im Präparat hängt von der Stammzellquelle und der Prozessierung ab (Abbildung 1.3).

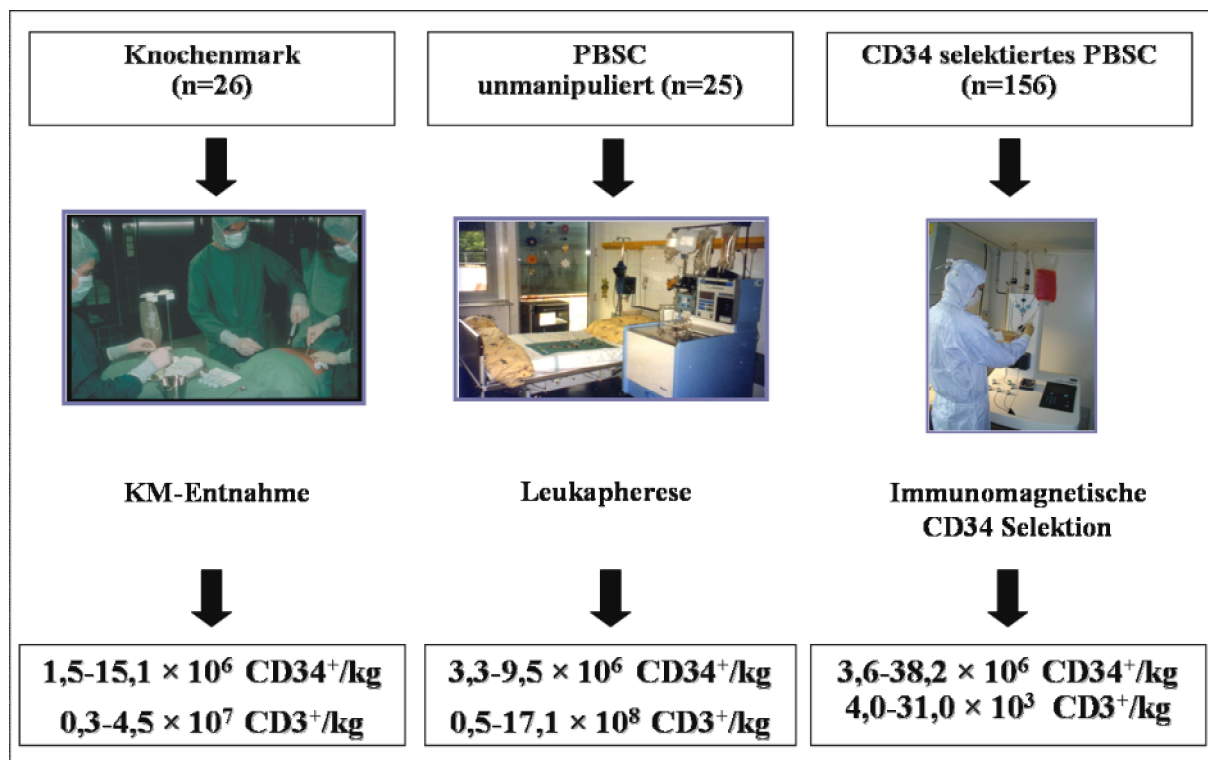


Abbildung 1.3: Produktion der Stammzelltransplantate. Die Stammzellen (CD34⁺) können aus den unterschiedlichen Quellen gewonnen werden; CD3⁺ = T-Zellen.

Es kann zwischen der autologen und allogenen Stammzelltransplantation (SZT) unterschieden werden. Die **autologe SZT** ist näher betrachtet keine Transplantation, da Spender und Empfänger identisch sind. Sie findet vielmehr im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie als Rettung des Knochenmarks (*Rescue*) Anwendung. Dem Patienten werden zunächst seine eigenen Stammzellen entnommen, dann erfolgt die Hochdosis-Chemotherapie, die über die normal lethale Dosis hinaus intensiviert werden kann, und schließlich erfolgt die Reinfusion der Stammzellen. Diese Behandlung wird bei Krebserkrankungen mit sehr ungünstiger Prognose (bei Kindern z.B. beim Rezidiv eines Morbus Hodgkin oder im Rahmen von Therapiestudien beim Neuroblastom) angewendet. Des Weiteren kann die autologe SZT in Kombination mit einer Genterapie zum Einsatz kommen.

Allogen bedeutet, dass die Stammzellen von einem fremden Spender kommen, d.h. Spender und Empfänger sind nicht identisch. Im Gegensatz zu der autologen SZT handelt es sich bei der **allogenen SZT** um eine Organtransplantation. Sie wird zur Therapie maligner Erkrankungen des Knochenmarks und genetischer Defekte, die ihren Ursprung im blutbildenden System haben wie z.B. X-SCID (*X-linked severe combined immunodeficiency syndrome*), Chronische Granulomatose, Fanconi-Anämie oder Gaucher-Krankheit,

angewendet. Darüber hinaus kann sie auch bei malignen soliden Tumoren zum Einsatz kommen, jedoch sind solche Therapieregime erst am Anfang der Entwicklung.

1.2.1 Spenderauswahl und HLA-Kompatibilität

Bei einer allogenen SZT muss ein geeigneter Spender gesucht werden. Entscheidend ist die Übereinstimmung der MHC-Merkmale (MHC = *major histocompatibility complex*). Beim Menschen bezeichnet man diese Merkmale auch als HLA-Merkmale (*human leukocyte antigen*); die Begriffe können synonym verwendet werden.

Wenn sich Spender und Empfänger in ihren HLA-Molekülen, die auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen exprimiert werden, unterscheiden, kommt es zu einer Immunreaktion der T-Zellen des einen gegen diese Gewebemerkmale des anderen und umgekehrt.

Physiologisch besteht die Aufgabe der MHC-Moleküle darin, Peptidfragmente von Pathogenen im Körper zu binden und den T-Zellen zur Erkennung zu präsentieren. Damit wird die adaptive Immunantwort eingeleitet. Außerdem können auch körpereigene Peptidfragmente, die als *minor histocompatibility antigens* (mHA) bezeichnet werden, auf den HLA-Molekülen gebunden werden. Dadurch erfolgt eine differenzierte Unterscheidung zwischen selbst und fremd im Körper.

Die HLA-Moleküle bestehen aus α - und β -Ketten, die polygen durch MHC-Klasse-I und Klasse-II-Gene codiert werden, so dass jedes Individuum über mehrere Moleküle mit verschiedenen Peptidbindungsspezifitäten verfügt.

Tabelle 1.1

MHC-Klasse-I-Gene	HLA-Moleküle
Klasse I	A, B, C
Klasse II	DP, DQ, DR

Die Gene sind zusätzlich hoch polymorph, d.h für jedes Gen gibt es mehrere Allele. Allele sind die individuellen Genvarianten an einem Locus (Genort). In der IMG/HLA Datenbank (www.ebi.ac.uk/imgt/hla) sind bereits mehr als 1500 von der WHO (*World Health Organisation*) anerkannte HLA-Allele gelistet (Marsh 2003). Außerdem werden alle Allele codominant exprimiert; codominant bedeutet, dass die Proteine von beiden homologen Chromosomen exprimiert werden.

Aufgrund dieses starken Polymorphismus ist es nicht leicht, einen passenden Spender zu finden. Da aber die Gene immer von beiden Elternteilen gleich vererbt werden, ist die Wahrscheinlichkeit, eine Übereinstimmung zu finden, bei Geschwisterkindern am größten. Ein Viertel der Geschwister sind aufgrund der Vererbung HLA-kompatibel, wobei die wirkliche Inzidenz durch cross-over Phänomene bei der Meiose jedoch niedriger ist. Eineiige Zwillingsgeschwister hingegen sind vollident (syngen), während die Eltern meist haploident sind. Außerhalb der Familie besteht die Möglichkeit, nach einem HLA-identen Fremdspender suchen. Bei der weltweit größten Spenderdatei „Deutsche Knochenmarkspenderdatei“ (DKMS) sind 1,4 Millionen Spender registriert.

Für Kinder mit Leukämien werden nicht nur Stammzellen von HLA-identischen Familienspendern akzeptiert, sondern auch HLA-idente Fremdspender. Bei Patienten mit besonders schlechter Prognose sind im Einzelfall auch experimentelle Transplantationen, wie haploidente SZT, zugelassen. Die HLA-Kompatibilität ist entscheidend hinsichtlich des Risikos, dass das Transplantat abgestoßen wird. Deshalb ist eine haploidente Transplantation besonders riskant. Hierbei spielen immunologische Spender-Empfänger-Reaktionen eine besondere Rolle, die einerseits eine Bedrohung darstellen, sich aber andererseits auch positiv nutzen lassen.

Tabelle 1.2 Die Varianten der Stammzelltransplantation.

HLA-ident	MFD <i>matched family donor</i>	Geschwister oder andere Verwandte
	MUD <i>matched unrelated donor</i>	Identer Fremdspender
haploident	MMRD <i>mismatched related donor</i>	Nicht-identer verwandter Spender
	MMUD <i>mismatched unrelated donor</i>	Nicht-identer Fremdspender

HLA-ident bedeutet, dass 8 von 8 untersuchten Genloci bei Spender und Empfänger identisch sind oder höchstens ein Mismatch vorhanden ist. Bei einer Differenz von 2-3 Merkmalen spricht man von haploident. Es werden die für die Transplantation am wichtigsten HLA-Antigene HLA-A, -B, -C und DR untersucht. Da die Gene codominant exprimiert werden, werden letztendlich 8 Genloci sequenziert. Um die Sicherheit des *full antigen match* zu erhöhen, wird häufig noch der HLA-DQ Locus untersucht.

Zusätzlich kann außerdem ein serologischer Test auf Kompatibilität durchgeführt werden, in dem man die Spender- und Empfängerzellen in der Zellkultur stimuliert und miteinander mischt (*mixed lymphocyte reaction*; MLR).

Die allogene SZT bietet gegenüber der konventionellen Chemotherapie zwei besondere Vorteile. Zum einen kann die Chemotherapie intensiviert werden. Die meisten Chemotherapeutika zeigen in ihrer zytostatischen Wirkung eine proportionale Dosis-Wirkungs-Kurve ohne *Ceiling*-Effekt. Folglich werden die malignen Zellen umso besser eliminiert, desto höher dosiert wird – die gesunden Zellen jedoch auch, so dass eine akute Knochenmarktoxizität auftritt und meist dosislimitierend ist. Die transplantierten Stammzellen können den Patienten aber aus der Aplasie retten.

Zum anderen zeigt die allogenen SZT einen immuntherapeutischen Effekt.

1.2.2 Immunologische Spender-Empfänger-Reaktionen

Das Transplantat kann einen therapeutischen Effekt gegen die Leukämie des Patienten zeigen. Dieser immuntherapeutische Effekt wird **GvL-Effekt** (*graft-versus-leukemia effect*) genannt. Hierbei spielen die T-Zellen im Transplantat eine besondere Rolle. Im dem Fall, dass nicht alle malignen Zellen des Patienten durch die Vorbereitung auf das Transplantat zerstört worden sind, können die restlichen Leukämiezellen durch die Spenderlymphozyten eliminiert werden. Die T-Lymphozyten des Spenders erkennen zum einen die fremden HLA-Moleküle und zum anderen die fremden Peptidfragmente, die auf den HLA-Molekülen gebunden sind (mHA). In Studien wurde deutlich, dass Empfänger mit einem syngenem Stammzelltransplantat oder einem T-Zell-depletierten Transplantat ein höheres Rezidivrisiko haben als Patienten mit einem schlechter gematchten Spender oder einem unprozessierten Transplantat (Gale, *et al.* 1994, Horowitz, *et al.* 1990, Marmont, *et al.* 1991). Offensichtlich ist die Ungleichheit zwischen Spender und Empfänger verantwortlich für den GvL-Effekt (Barnes und Loutit 2001).

Neben den T-Zellen tragen auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zum GvL-Effekt bei, jedoch liegen deren Wirkungsweise andere Mechanismen zu Grunde als bei T-Zellen.

Der GvL-Effekt lässt sich nicht trennen von der **GVHD** (*graft-versus-host disease*), eine potentiell tödlich verlaufende Nebenwirkung der SZT. Diese „Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit“ wird ausgelöst durch alloreaktive T-Zellen im Transplantat gegen den Empfänger. Im Bezug auf die T-Zellen liegen wahrscheinlich dieselben oder ähnliche Mechanismen zu Grunde wie beim GvL-Effekt. Je geringer die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und

Empfänger, desto größer die Gefahr, dass sich eine GVHD entwickelt. Die Donor T-Lymphozyten werden über restliche Antigen-präsentierende-Zellen (*antigen presenting cell*; APC) des Empfängers gegen dessen Proteine und Peptide stimuliert (Shlomchik, *et al.* 1999). In der Folge greifen die T-Zellen auch gesundes Gewebe an. Durch die Vorbereitung auf die Transplantation ist der Patient sehr stark chemo- und strahlengeschädigt, das Gewebe ist durchlässig, viele Zellen gehen in Apoptose und das biochemische Gleichgewicht ist gestört. Diese Bedingungen begünstigen eine Aktivierung der Spender-T-Zellen erheblich (Antin 2005).

Es wird zwischen der akuten und der chronischen GVHD unterschieden. Die akute Form tritt definitionsgemäß innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf; die chronische in der Regel danach. Diese Einteilung lässt sich jedoch nicht strikt einhalten, so dass letztendlich nach den Symptomen unterschieden werden sollte. Die akute GVHD wird abhängig von der Beteiligung der Organe in vier Schweregrade (I-IV) eingeteilt.

Tabelle 1.3 Schweregrade I-IV der akuten GVHD nach ICD-10 (T86.00)

Beteiligung der Organe (Stadium 1-4). Für die Haut werden zur Beurteilung die Bildung/Ausbreitung von Exanthenen und Papeln herangezogen. Zur Bewertung der Leberbeteiligung werden die Bilirubinspiegel gemessen (Stadium 1 \leq 3 mg/dl; Stadium 4 $>$ 15 mg/dl). Die Beteiligung des Verdauungstraktes bemisst sich an der Schwere der Durchfälle und Schmerzen.

Grad	Haut	Leber	Verdauungstrakt
I	1 oder 2	Keine Beteiligung	Keine Beteiligung
II	3	1	1
III	1 bis 3	2 oder 3	2 oder 3
IV	4	4	4

Die chronische GVHD wird nach der ICD-10 (*International Classification of Diseases – Version 10*) nur in die begrenzte (*limited*) und ausgeprägte (*extended*) Form unterteilt. Bei der begrenzten Form sind nur die Haut und die Leber beteiligt, während bei der ausgeprägten Form auch andere Organe betroffen sind. Die Etablierung eines besseren Systems zur Diagnose und Bewertung der chronischen GVHD auch unabhängig vom Zeitpunkt des Auftretens war bereits Gegenstand der NIH (*National Institutes of Health*) Consensus Konferenz Juni 2006.

1.2.3 Die Vorbereitung des Patienten auf die allogene Stammzelltransplantation

Nach der Diagnose und dem Finden eines geeigneten Spenders muss der Patient auf die allogene SZT vorbereitet werden. Diese Vorbereitung wird als Konditionierung bezeichnet und umfasst eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung in Verbindung mit der Gabe von Zytostatika in hoher Dosierung. Die Konditionierung führt zur Zerstörung des zellulären Immunsystems sowie der Blutbildung des Empfängers und erfüllt damit einen doppelten Zweck. Einerseits wird die maligne Grunderkrankung des Patienten so intensiv wie möglich und über das übliche Maß hinaus behandelt. Andererseits wird das vorhandene Knochenmark, von dem die Blutbildung ausgeht, zerstört, um Platz für das Transplantat zu schaffen.

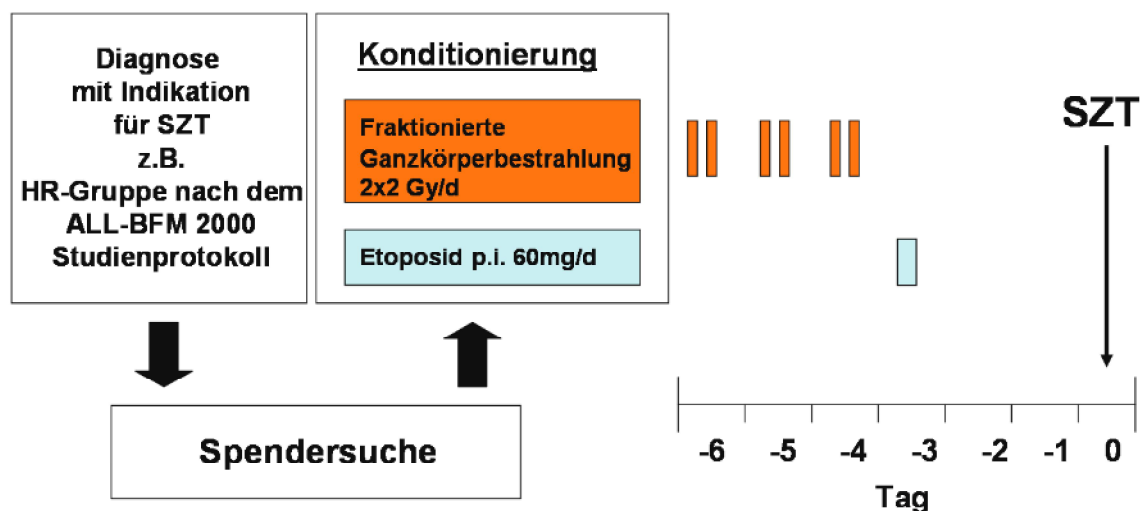


Abbildung 1.4 Die Vorbereitung (Konditionierung) auf eine Stammzelltransplantation. Dargestellt ist ein Beispiel für die SZT-Konditionierung bei Hoch-Risiko (HR)-Patienten nach dem ALL-BFM 2000 Studienprotokoll für Kinder ≥ 2 Jahre mit Geschwisterspendern als verwandte Spender. p.i. = per infusionem

Durch die Konditionierung rutscht der Patient in die Aplasie und als Folge ist das Immunsystem praktisch außer Kraft gesetzt. Das ist zwar notwendig, um das Anwachsen des Transplantats zu ermöglichen. Gleichzeitig ist der Patient aber der großen Gefahr ausgesetzt, infektiöse Komplikationen zu erleiden. Die Abwehr fakultativ pathogener Keime kann zu einem schwerwiegenden Problem werden, weshalb die Phase der Konditionierung von einer hohen Rate an Morbidität und Mortalität begleitet ist.

1.2.4 Die Phase nach der Transplantation

Auch nach Transplantation bleibt der Patient zunächst immunsupprimiert. In der Aplasie- und Regenerationsphase bis Tag 30 nach Transplantation sind es v.a. endogene Bakterien, die aufgrund der beschädigten Schleimhäute dem Patienten systemisch gefährlich werden. Außerdem stellen opportunistische Keime wie *Candida* und *Aspergillus* Pilzarten eine große Gefahr für infektiöse Komplikationen dar (Moore und Sakamoto 2005). Später ist der Patient hauptsächlich von *Aspergillus*-Pilzen und Viren bedroht (Afessa und Peters 2006). Bei den viralen Infektionen spielen persistierende Viren wie das Cytomegalovirus (CMV), Herpes-Simplex-Virus (HSV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Varicellovirus eine besondere Rolle. Diese zur Herpesfamilie gehörenden Viren können aufgrund der geschwächten Immunabwehr leicht reaktiviert werden. Darüber hinaus werden die für gesunde Menschen kaum pathogenen Adenoviren dem Patienten gefährlich. Die Abwehr pathogener Keime und Viren hängt sehr wahrscheinlich auch vom Gehalt der T-Zellen im Transplantat ab (Seidel, *et al.* 2005, van Tol, *et al.* 2005), wobei die Daten jedoch zum Teil widersprüchlich sind. Wie gut sich der Patient vor Infektionen schützen kann, hängt außerdem von seiner Immunrekonstitution nach Transplantation ab. Die Immunrekonstitution ist wiederum von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängig. Zu den bekannten Einflussgrößen gehören die Stammzellquelle, der Gehalt an $CD34^+$ Stammzellen und $CD3^+$ T-Zellen im Transplantat (Behringer, *et al.* 1999, Kook, *et al.* 1996), der CMV-Status des Patienten vor und nach Transplantation (Hakki, *et al.* 2003), der Verwandtschaftsgrad und die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger sowie das Alter des Patienten (Fallen, *et al.* 2003, Powles, *et al.* 1998) und das Auftreten einer GVHD (Gratama, *et al.* 1984). Der Erfolg der SZT und die Genesung des Patienten lassen sich entsprechend schwer prognostizieren. Eine wichtige Rolle scheinen jedoch die T-Zellen einzunehmen, die wie unter Kapitel 1.2.2 schon beschrieben einerseits das Anwachsen des Transplantats positiv beeinflussen und andererseits eine potentiell lebensbedrohliche GVHD auslösen können. Der Gehalt der T-Zellen im Transplantat oder der zusätzliche Einsatz von T-Zellen ist jedoch abhängig davon wie passend Spender und Empfänger sind, denn die HLA-Kompatibilität bestimmt wie das Transplantat prozessiert wird. Bei HLA-identen Transplantationen (MFD und MUD) werden die $CD34^+$ Stammzellen unter Anwendung einer GVHD-Prophylaxe (z.B. mit Cyclosporin A) unmanipuliert transplantiert. Hierbei wird bewusst die Gefahr einer GVHD hingenommen, um sich des GVL-Effektes bedienen zu können. Bei haploidenten Transplantationen werden die

Stammzellen über das CD34 Oberflächenmolekül angereichert. Dieses Verfahren entspricht quasi einer T-Zelldepletion. Alternativ kann auch eine CD3/CD19 Depletion durchgeführt. Über das CD3 Oberflächenmolekül werden die T-Zellen und über das CD19 Oberflächenmolekül werden die B-Zellen eliminiert. Ein solches Transplantat enthält keine GVHD verursachenden T-Zellen mehr, aber gleichzeitig konnten andere Zelltypen, die einen potentiell antileukämischen Effekt zeigen, erhalten bleiben (Lang, *et al.* 2005). Zu diesen Zelltypen gehören die NK- Zellen und dendritischen Zellen, auf die im Folgenden noch eingegangen wird.

1.3 Adaptive Immuntherapie

Bei unmanipulierten Transplantaten ist die SZT aufgrund des GvL-Effektes per se schon eine Immuntherapie. Um sich diesen immuntherapeutischen Effekt gezielter zunutze zu machen, werden die immunologisch wirksamen Zellen auch separat - als eigene Therapie - dem Patienten appliziert. Diese Art der Immuntherapie wird auch als adaptive Immuntherapie bezeichnet.

1.3.1 T-Zellen (Donor-Lymphozyten-Infusion)

Viele Studien konnten zeigen, dass sich die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) erfolgreich einsetzen lässt, um ein Rezidiv zu behandeln (Marijt und Falkenburg 2001). Eine DLI kann als eine nicht weiter behandelte Blutprobe des Stammzellspenders oder als separierte mononukleäre Zellen (MNZ) aus einem Apheresat gewonnen zur Anwendung kommen. Der Gehalt an T-Zellen im Vollblut liegt zwischen 55%-84% (Bisset, *et al.* 2004) und in MNZ zwischen 70%-90% (eigene Daten). Aufgrund des hohen Anteils sowie der beobachteten Nebenwirkung geht man davon aus, dass T-Zellen in einer DLI wirkbestimmend sind. Als dosisabhängige Nebenwirkung tritt häufig die GVHD auf. Sofern die GVHD nur mild ausgeprägt ist und nicht mit Immunsuppressiva behandelt werden muss, kann davon ausgegangen werden, dass die DLI Wirkung zeigt und ein GvL-Effekt ausgeübt wird. Außerdem kann das Transplantat besser anwachsen, da auch restliche Empfängerzellen eliminiert werden.

Jedoch zeigen sich abhängig von der Art der Erkrankung große Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf eine DLI Gabe. Während bis zu 80% der CML Rezidive auf eine Donor-Lymphozyten-Infusion ansprechen (Giralt und Kolb 1996), konnten offene Rezidive der akuten Leukämien bislang kaum therapiert werden. Patienten mit einer akuten Leukämie, bei denen schon früh eine minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*; MRD = Nachweis von malignen Zellen im submikroskopischen Bereich mit molekularbiologischen Methoden) oder eine Abnahme der Spenderzellen in der Chimärismusanalyse nach Transplantation diagnostiziert wird, sprechen wiederum gut auf eine DLI an (Bader, *et al.* 2004, Sanchez, *et al.* 2002). Die Abnahme der Spenderzellen nach Transplantation bedeutet, dass sich die restlichen Zellen des Empfängers erholen und ein sogenannter *mixed chimerism* auftritt. Für den Patienten liegt eine positive Situation vor, wenn der Chimärismus 100% Spenderzellen aufweist oder der Anteil der Spenderzellen nach Transplantation systematisch zunimmt. Nimmt der Anteil der Spenderzellen ab, deutet sich die Abstoßung des Transplantats oder auch ein Rezidiv an. Deswegen kann es von großem Nutzen sein, den Empfänger-Spender-Chimärismus engmaschig zu kontrollieren. Die Untersuchungen erfolgen mittels *short-tandem* und *variable-tandem-repeat* Analysen (*fingerprinting*) (Bader, *et al.* 1998, Beck, *et al.* 2006, Koehl, *et al.* 2003).

1.3.2 Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine bedeutende Rolle zur Bekämpfung von Viren und malignen Erkrankungen, ohne dass sie vorher mit einem Antigen in Kontakt gewesen sein müssen. Ihr Anteil im Blut beträgt ca. 10%. Die Zielzellen werden von den NK-Zellen mit Hilfe ihrer Rezeptoren (*killer immunoglobulin-like receptors*; KIR), die in inhibitorische und aktivierende Rezeptoren unterschieden werden können, erkannt. Die aktivierende Erkennung erfolgt über fremde Proteine (z.B. Viren) oder körpereigene, hochregulierte Proteine (z.B. aufgrund von Zellstress durch Infektion oder Transformation). Gleichzeitig werden immer körpereigene MHC-Moleküle über die inhibitorischen Rezeptoren abgetastet. Sind diese Moleküle herunterreguliert, fehlt das inhibitorische Signal und die NK-Zelle lysiert die Zielzelle. Die NK-Zellaktivierung ist entsprechend ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen (Walzer, *et al.* 2005). Es zeigte sich bei haploidenten

Transplantationen, dass ein KIR mismatch in GvH-Richtung mit einer geringeren Rezidivrate im Vergleich zu KIR kompatiblen Transplantaten verbunden ist (Passweg, *et al.* 2005, Ruggeri, *et al.* 2002). NK-Zellen als Immuntherapie haben den besonderen Vorteil, dass sie keine oder nur eine geringe GVHD verursachen.

1.3.3 Dendritische Zellen

Das Interesse an Dendritischen Zellen (*dendritic cell*; DC) in der Immuntherapie wächst. Sie sind sehr gute APCs und sollen helfen, andere Effektorzellen des Immunsystems zu aktivieren. DCs patrouillieren durch den Körper und nehmen jede Art von Antigenen auf, um diese anderen Zellen über MHC-Moleküle zu präsentieren. Die Aktivierung von T-Zellen findet insbesondere in den Lymphknoten statt, wobei zusätzlich Co-Rezeptoren eine Rolle spielen (Shortman und Liu 2002).

Eine schlechte Antigenpräsentation könnte auch ursächlich dafür verantwortlich sein, dass die DLI bei akuten Leukämien nur begrenzt Wirkung zeigt (Marijt und Falkenburg 2001).

1.4 Gentherapie

Die Gentherapie basiert auf dem Prinzip, dass ein fehlendes oder nicht funktionierendes Gen ersetzt wird. Jedoch stellte das Einbringen des Gens in die Zelle zu Beginn ein großes Hindernis für die Anwendung dieser Therapieform dar.

1.4.1 Methoden des Gentransfers

Die genetische Information kann als nackte DNA Moleküle oder in Liposomen verpackt in den Körper gebracht werden, wobei die Aufnahme in die Zellen gering ist. Abgesehen von der geringen Effizienz bereitet die geringe Gewebespezifität (*targeting*) ein Problem.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dem Patienten die Zielzellen zu entnehmen und in der Zellkultur zu manipulieren. Hierbei kann die Elektroporation oder die Präzipitationsmethode Anwendung finden. Gemeinsam ist diesen Methoden des Gentransfers, dass die genetische Information nicht stabil, sondern nur transient in die Zelle eingebracht wird und damit bei der Teilung verloren geht. Ein anhaltender therapeutischer Erfolg kann nicht erzielt werden.

Des Weiteren stehen virale Methoden zum Gentransfer zur Verfügung, die sich des Infektionsmechanismus der Viren bedienen. Der Gentransfer mittels viraler Genfähren wird als Transduktion bezeichnet. Als Gerüst können z.B. Adeno-, Adeno-assoziierte, Herpes- und Retroviren verwendet werden. Retroviren besitzen den Vorteil, dass die genetische Information in das Genom integriert und damit stabil exprimiert wird. Die Retroviren können in α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie Lenti- und Spumaretroviren unterteilt werden. Für die Gentherapie werden hauptsächlich γ -Retroviren eingesetzt. Zu den Lentiviren gehört auch das humane Immundefizienzvirus (*human immunodeficiency virus*; HIV). Entsprechend vorsichtig werden von diesem Virus abgeleitete Genfähren verwendet – bis heute nur in einem einzigen Fall: Bei einer Gentherapie für HIV-positive Patienten (Morris 2005). Die γ -Retroviren wurden früher auch als Onkoviren bezeichnet; zu ihnen gehört auch das Moloney-Mausleukämievirus, auf dessen Basis der Standardvektor für Gentherapien aufbaut.

1.4.2 Gamma-Retrovirale Vektoren

γ -Retroviren sind RNA-Viren, die ihre genetische Information in der Wirtszelle in cDNA umschreiben (revers transkribieren) und in das Wirtsgenom einbauen (integrieren).

Der Infektionszyklus (Abbildung 1.5) umfasst

1. das Andocken an die Zelle und das Eindringen,
2. die Freisetzung und reverse Transkription des Genoms,
3. den Transport in den Zellkern,
4. die Integration der viralen genetischen Information in das Genom des Wirts,
5. die Transkription (und Spleißen)
6. die Translation viraler Proteine und deren Verpackung inklusive der genomischen RNA und
7. das Knospen neuer viraler Partikel.

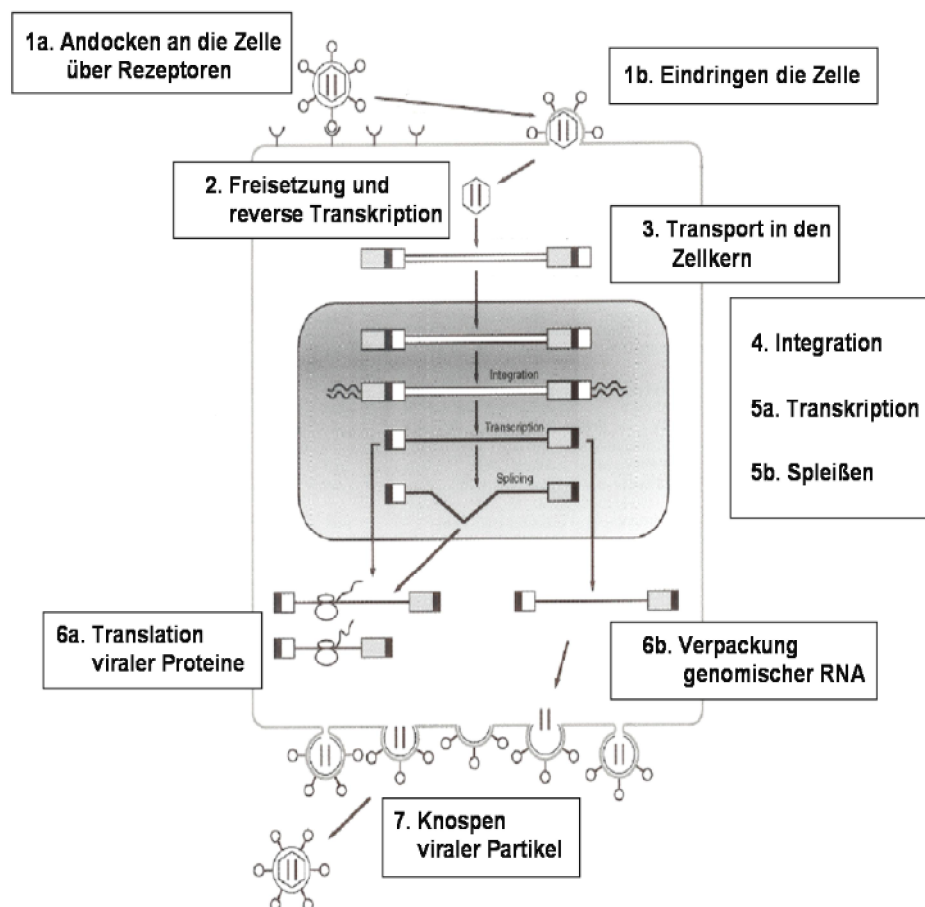


Abbildung 1.5 Replikationszyklus des Retrovirus

Retroviren haben drei essentielle Gene zur Replikation:

1. gag: kodiert für gruppenspezifische Antigene (Strukturproteine für das Capsid und die Matrix)
2. pol: kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase, Polymerase und RNaseH
3. env: kodiert für die Glykoproteine der äußeren Hülle

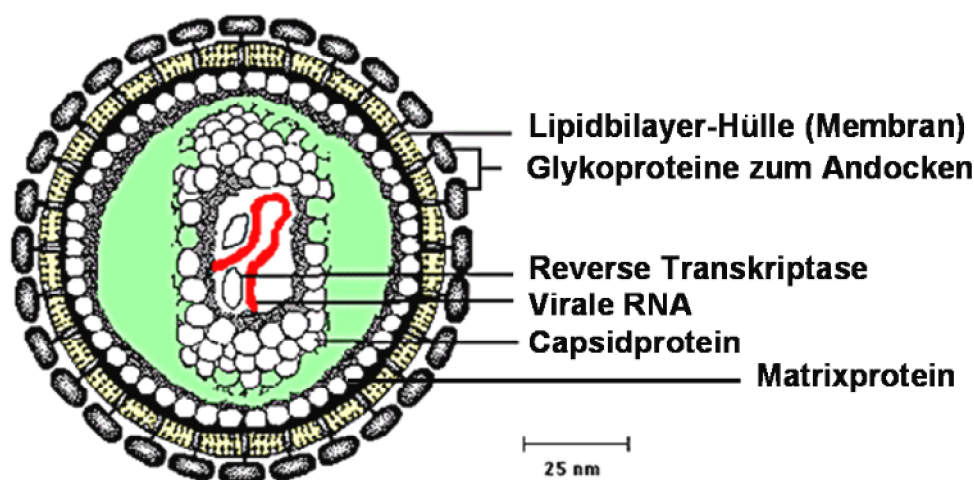


Abbildung 1.6 Aufbau des Retrovirus. Die Glykoproteine werden von env, Capsid- und Matrixprotein von gag und die reverse Transkriptase sowie andere Enzyme von pol kodiert. Die Membran besteht aus der Zellmembran des Wirts mit den eingebauten viralen Proteinen.

Zur Verwendung retroviraler Vektoren bedarf es eines Systems, in dem die Gene zur Replikation *in trans* zur Verfügung gestellt werden und das therapeutische Gen als einzige genetische Information verpackt wird.

Ein entsprechendes System (Abbildung 1.7) basiert auf einer Verpackungszelllinie, die zur Produktion nicht-replikationskompetenter viraler Partikel verwendet wird. Die Verpackungszellen - eine adhäre Zelllinie - werden einerseits mit gag, pol und env und andererseits mit dem therapeutischen Gen in Form eines Plasmids (kleine zirkuläre DNA, die extrachromosomal von Organismus zu Organismus übertragen werden kann) transfiziert.

Das therapeutische Gen ist von den viralen LTR (*long terminal repeats*) eingerahmt, die als Promotor fungieren. Außerdem enthält der Vektor mit dem therapeutischen Gen ein Verpackungssignal ψ , das der Zelle die Information liefert, dass diese genetische Information nicht gespleißt und translatiert, sondern als vollständige RNA verpackt werden soll.

Das env Gen lässt sich variieren, kann also auch von einem anderen Virus stammen als gag und pol. Dadurch kann die Spezifität gestalterisch variiert werden. Dieses Re-Targeting bezeichnet man auch als Pseudotypisierung.

Zur Transduktion mit γ -retroviralen Vektoren müssen die Zielzellen zunächst aktiviert werden. Die induzierte Teilung und damit das Verschwinden der Kernmembran während der Mitose macht es überhaupt erst möglich, dass der Vektor in den Zellkern gelangt und in die DNA integriert werden kann. Abhängig von der Art der Zielstelle werden unterschiedliche Protokolle zur Aktivierung angewendet. Die Protokolle können Zytokine, Wachstumsfaktoren und auch monoklonale Antikörper zur Stimulierung spezifischer Rezeptoren beinhalten.

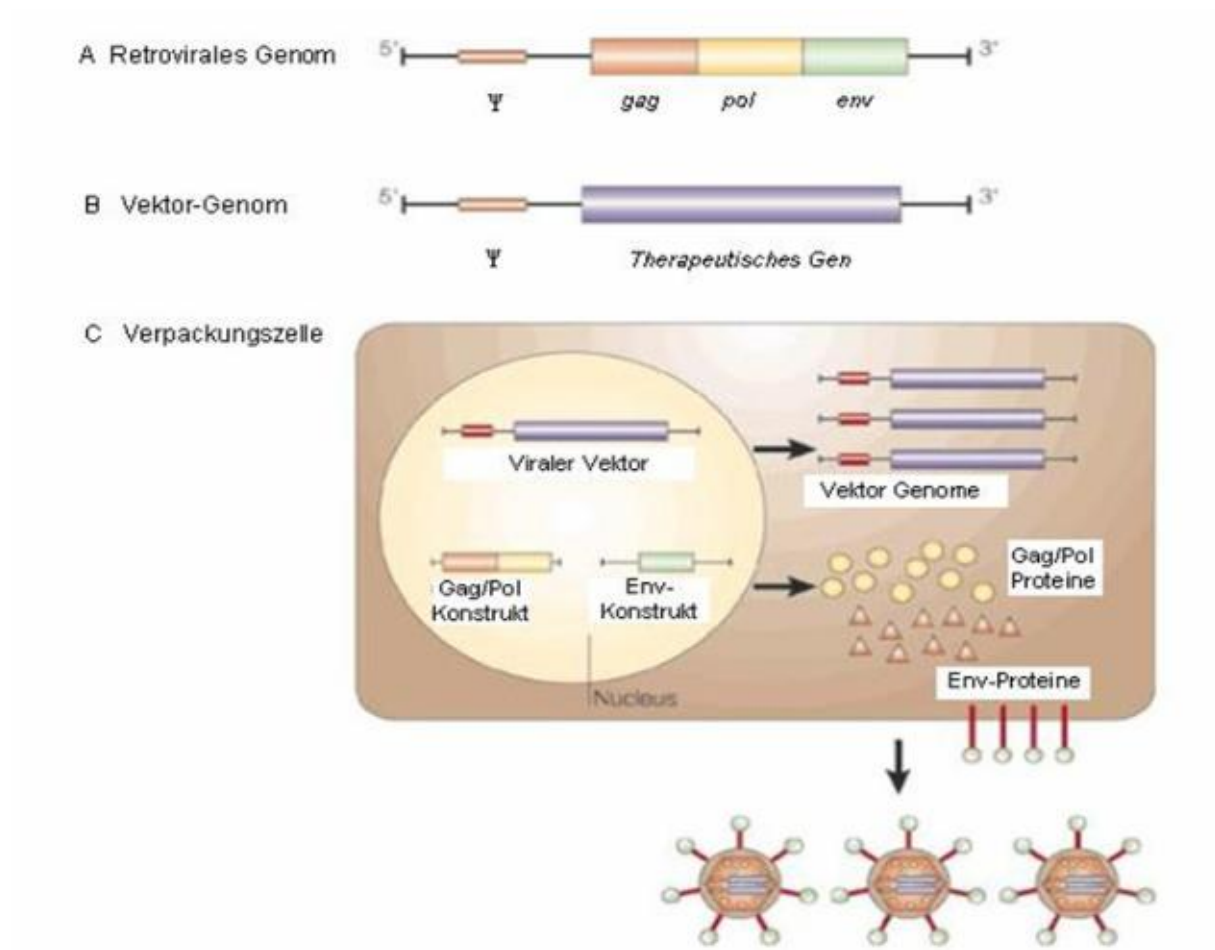


Abbildung 1.7 Produktion des retroviralen Virusüberstandes. **A.** Das retrovirale Genom als Wildtyp enthält das Verpackungssignal ψ und die Gene gag, pol und env. Das Verpackungssignal ist notwendig, um die genetische Information vollständig in Form von viraler RNA in die neugebildeten Viruspartikel zu verpacken. **B.** Der Vektor zur Gentherapie enthält keine viralen Gene mehr zur Replikation; diese wurden durch das therapeutische Gen ersetzt. Das Verpackungssignal bleibt erhalten, so dass die genetische Information des therapeutischen Gens verpackt wird. **C.** Die viralen Gene befinden sich auf separaten Vektoren und werden mittels Transfektion zusammen mit dem therapeutischen Vektor in die Verpackungszelle eingebracht. Allerdings enthalten die Vektoren mit den viralen Genen kein Verpackungssignal. Die viralen Proteine werden nur translatiert; die genetische Information gelangt nicht in die neuen Viruspartikel. Mit den Viruspartikeln, die als Überstand von den Verpackungszellen gesammelt werden, können Zielzellen transduziert werden. Zur Integration des therapeutischen Gens in das Genom der Zielzelle stehen die notwendigen Enzyme schon im Viruspartikel zur Verfügung.

1.4.3 Risiken des retroviralen Gentransfers

Im September 1999 verstarb ein Teilnehmer an einer klinischen Studie zur Gentherapie eines Enzymdefektes an einer Überdosis des applizierten adenoviralen Vektors (Spink und Geddes 2004). Es kam zu einer unkontrollierten Immunreaktion auf den Vektor.

Wenig später, im Oktober und Dezember 2002, folgten die Meldungen des Necker Hospitals in Paris. Es wurde bekannt gegeben, dass zwei Kinder im Rahmen einer klinischen Studie zur Behandlung des genetischen Immundefekts X-SCID (*X-linked severe combined immunodeficiency syndrome*) an einer Leukämie erkrankt sind. Der retrovirale Vektor hatte sich in der Nähe des Proto-Onkogens LMO2 integriert und damit eine T-Zellleukämie ausgelöst (Hacein-Bey-Abina, *et al.* 2003). Später erkrankte noch ein drittes Kind (Dropulic 2005). Bei X-SCID handelt es sich um eine Erkrankung im blutbildenden System monogenetischen Ursprungs. Aufgrund eines Defekts im Gen für die gemeinsame γ -Kette mehrerer Zytokinrezeptoren entwickeln sich keine T-Zellen, so dass die Patienten schwer immundefizient sind. Alternativ zu einer allogenen SZT wurden den Patienten ihre eigenen hämatopoetische Stammzellen entnommen, mit der γ -Kette ex vivo transduziert und als autologe SZT zurückgegeben.

Die γ -retrovirale Transduktion hämatopoetischer Stammzellen erscheint als besonders riskant, da viele Gene, die für Neubildung und Proliferation von Bedeutung sind, noch nicht wie in differenzierten Zellen abgeschaltet sind. Hinzu kommt, dass sich γ -retrovirale Vektoren bevorzugt dort integrieren, wo sich Transkriptionsanfänge von Genen befinden (Seggewiss und Dunbar 2005).

1.5 DLI mit Suizidgen tragenden T-Zellen

Bei einer DLI mit Suizidgen tragenden T-Zellen wird die Immuntherapie gentherapeutisch modifiziert, um die Donor-Lymphozyten-Infusion sicherer zu gestalten. Eine DLI wird als separate Immuntherapie nach SZT eingesetzt, um einer Abnahme der Spenderzellen entgegenzuwirken und damit das Anwachsen des Transplantats zu unterstützen oder ein drohendes Rezidiv abzuwenden. Außerdem können die T-Zellen in einer DLI die Immunrekonstitution verbessern. Diese Effekte werden auch unter dem Begriff GvL-Effekt zusammengefasst (Bondanza, et al. 2005). Gleichzeitig besteht bei der Gabe einer DLI die Gefahr, dass die T-Zellen eine potentiell tödlich verlaufende GVHD induzieren (Tiberghien 2001).

Um dieses Dilemma zu lösen, wurde die Suizidstrategie entwickelt. Die T-Zellen des Spenders werden ex vivo mit einem Vektor transduziert, der für ein Suizidgen und einen Oberflächenmarker kodiert. Das Suizidgen ermöglicht eine selektive Elimination der transduzierten Zellen durch Gabe eines entsprechenden Suizidinduktors. Der Oberflächenmarker, der an dem Suizidgen fusioniert vorliegt, aber an der Oberfläche exprimiert wird, erlaubt es, die transduzierten, Suizidgen tragenden Zellen immunomagnetisch aufzureinigen. Nach der Selektion sollten möglichst > 99% Suizidgen-positive Zellen vorliegen, die dem Patienten als DLI bei fallendem Chimärismus oder diagnostizierter MRD appliziert werden können. Werden restliche Tumorzellen ohne GVHD eliminiert, ist der gewünschte GvL-Effekt ohne Komplikation eingetreten. Entwickelt sich jedoch eine GVHD, können die T-Zellen durch Gabe des Suizidinduktors in die Apoptose gebracht werden (Abbildung 1.8).

Mehrere klinische Studien haben gezeigt, dass die Strategie praktisch anwendbar ist und eine auftretende GVHD durch die Gabe des Suizidinduktors erfolgreich bekämpft werden kann (Bonini, et al. 1997, Link, et al. 1998, Tiberghien, et al. 2001). Überraschend war jedoch, dass die GVHD sehr viel seltener als üblich bzw. erst nach Applikation eskalierender T-Zellmengen auftrat. So wurden in einer Studie 1×10^7 T-Zellen/kg Körpergewicht im Rahmen einer haploidenten Transplantation verabreicht, ohne dass eine GVHD auftrat (Ciceri, et al. 2005).

Damit stellt sich die Frage, ob der gewünschte GvL-Effekt überhaupt eintreten kann, wenn die Nebenwirkung von Beginn an ausbleibt. Es scheint, dass die T-Zellen durch die Manipulation ihre immunologische Kompetenz einbüßen. Die eingeschränkte Funktionalität

der T-Zellen ist wahrscheinlich auf die Aktivierung zurückzuführen, die notwendig ist, um die T-Zellen mit einem retroviralen Vektor zu transduzieren. In der ersten klinischen Studie von Bonini et al. wurde Phythämagglutinin (PHA), ein besonders starkes und unspezifisches Mitogen, zur Stimulierung der T-Zellen verwendet. Diese unspezifische Aktivierung wurde in einer zweiten Studie von Tiberghien et al. durch einen monoklonalen Antikörper gegen CD3 in Kombination mit 500 U/ml IL-2 ersetzt. Diese Kombination wurde auch in den folgenden klinischen Studien eingesetzt, wobei die Inzidenz der GVHD weiterhin niedriger als bei einer konventionellen DLI lag.

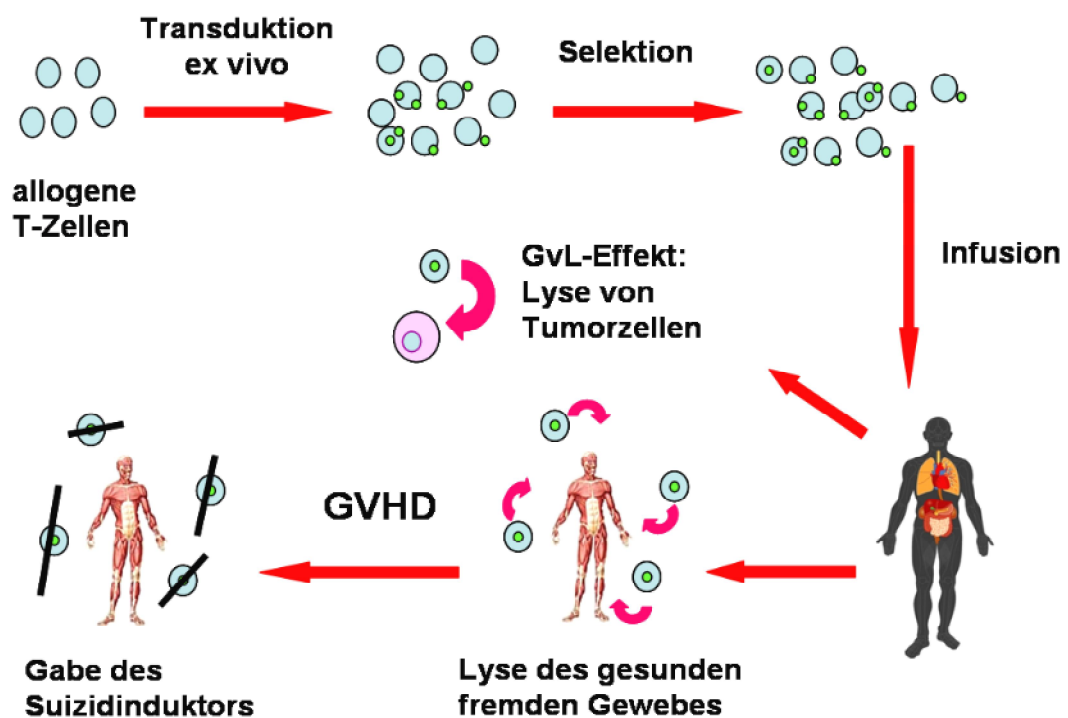


Abbildung 1.8 Suizidstrategie

1.5.1 Der Wirkmechanismus des Suizidgen Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus

Bei den genannten klinischen Studien wurde als Suizidgen die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus I (HSV-TK) verwendet. Vorteil dieses am häufigsten verwendeten Suizidgens ist, dass der Suizidinduktor, Ganciclovir, ein zugelassenes Fertigarzneimittel und somit ausreichend erprobt ist. Ganciclovir ist ein Prodrug, das zur Therapie von Virusinfektionen der Herpesfamilie Verwendung findet. Wie andere Wirkstoffe aus dieser Gruppe der Virusstatika ist Ganciclovir ein Antimetabolit, der Guanidin ähnlich ist, jedoch einen falschen Zucker trägt. Um während der Zellteilung in die DNA eingebaut zu werden, muss es als Triphosphat vorliegen. Die humanen Kinasen zur Phosphorylierung der Basenbausteine haben nur eine geringe Affinität zu Ganciclovir, während die HSV-TK den Antimetabolit phosphoryliert. Liegt Ganciclovir als Monophosphat vor, phosphorylieren zelluläre humane Kinasen das Ganciclovir-Monophosphat schnell zum Triphosphat, und es steht genügend Energie zur Verfügung, um den falschen Basenbaustein in die DNA einzubauen. Der falsche Zucker verhindert eine weitere Bindung für das Zucker-Phosphat-Rückrad der DNA und es kommt zum Kettenabbruch – die Zelle leitet die Apoptose ein.

Das Medikament Ganciclovir als Suizidinduktor wurde von den Patienten in den klinischen Studien gut vertragen. Außerdem ist der Wirkmechanismus des Medikaments für eine Suizidstrategie gut geeignet, da sich die T-Zellen, die eine GVHD induzieren und aufrechterhalten, in einem aktivierten Zustand befinden und proliferieren. Als Antimetabolit wirkt Ganciclovir insbesondere auf proliferierende Zellen toxisch.

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen der Suizidstrategie müssen die Spender-T-Zellen ex vivo in Kultur genommen und mit dem Suizidgen transduziert werden. Die Transduktion bedingt, dass die T-Zellen zunächst aktiviert werden müssen. Aktuelle Aktivierungsprotokolle scheinen jedoch einen negativen Einfluss auf die immunologische Kompetenz der T-Zellen zu haben, denn in den ersten klinischen Studien trat die GVHD sehr viel seltener als erwartet auf.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der Aktivierung und der genetischen Manipulation auf die primären humanen T-Zellen untersucht werden.

Die Hauptziele dieser Arbeit sind

- Protokolle zur Aktivierung humaner primärer T-Zellen unter Verwendung löslicher und auf Beads gekoppelter Antikörper zu etablieren,
- die etablierten Protokolle miteinander zu vergleichen mit Hinblick auf
 - ⇒ die Expansion und Vitalität der T-Zellen,
 - ⇒ klonale Veränderungen verschiedener Zellsubpopulationen während der Expansion, vor und nach der Transduktion,
 - ⇒ die Transduktionseffizienz in bestimmte T-Zellsubpopulationen,
 - ⇒ die Expansion antigenspezifischer T-Zellen CMV-positiver Spender
 - ⇒ und die Zytokinproduktion.

Die Nebenziele dieser Arbeit sind

- Stammzellen in stimulierten Apheresaten zu identifizieren und deren Fähigkeit zur Expansion unter T-Zellstimulierung zu untersuchen,
- die T-Zellen im klinischen Maßstab anzureichern.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Auftaegerät plasmatherm	Barkey, Leopoldshöhe
Beutelpresse FOR 4414	Baxter Fenwal, Unterschleißheim
Beutelizeutrifuge: Cryofuge 8000	Heraeus, Hanau
Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus, Hanau
CBA, Cytometric Bead Array-Gerät	BD Biosciences, Heidelberg
➤ 2 Laser (523 nm und 635 nm)	
➤ Probenverarbeitung in Mikrotiterplatten	
➤ Integrierte Auswertungssoftware (BD FACSAArray)	
CliniMACS-Gerät	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Unterschleißheim
Durchflusszytometer FC500	Beckman Coulter, Krefeld
➤ 5-Farbdurchflusszytometer (FITC, PE, ECD, PC5 oder APC und PC7)	
➤ 2 Laser (488 nm und 635 nm)	
➤ Photomultiplier	
➤ mit Probenkarussell	
➤ Integrierte Auswertungssoftware (CXP)	
Einfrieranlage	Air Liquide, Düsseldorf
Hämatologisches Zählgerät Coulter A ^C -T diff	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlschrank (4°C, -20°C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, elektrisch	Hirschmann, Eberstadt
Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Sterilbank, Hera safe	Heraeus, Hanau
Steriler Tubing-Konnektor TSCD-II	Terumo, Phoenix (USA)
Stickstoff-Lagerbehälter „Chronos“	Messer, Griesheim
➤ Mit der Steuereinheit ADUR®	
➤ Inklusive eines Vorratstanks für flüssigen Stickstoff APOLLO®	
➤ Anschluss für Alarmanlage	
➤ Kontinuierliche Lagerung bei -196°C	
Tiefkühltruhe (-80°C)	Heraeus, Hanau
Tischzeutrifuge: Multispin	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Ika, Staufen
Wasserbad	Grant, Berlin
Zeutrifugen: Multifuge 1 S-R, 3 S-R, 4 K	Heraeus, Hanau

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar, Offenburg
CliniMACS Tubing Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Drei-Wegehahn	MiroMed, Tuttlingen
Drei-Wegehahnbank	MiroMed, Tuttlingen
Heidelberger Verbindungen (Luer-Lock)	MiroMed, Tuttlingen
Kanülen Terumo Luer	BSD Hessen, Frankfurt
Kryo-Röhrchen	Greiner, Nürtingen
Luer-Lock-Spritzen (3, 5, 10, 20, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Magnete Mini/Midi MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnettafel (MACS Multi Stand)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pall-Vorfilter	PALL, Darmstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Polystyrol-Röhrchen, 5ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Falcon, München
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Falcon, München
Selektionssäulen (MS ⁺ , LS ⁺)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Transfer-Beutel Compoflex	Fresenius, Bad Homburg
Vuelife Beutel zur Expansion	Afc (CellGenix), Freiburg
Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24 Loch-Platten)	Falcon, München

3.1.3 Chemikalien, Medien und Zusätze für die Zellkultur

CliniMACS PBS/EDTA Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Ficoll-Dichte-Gradientenlösung 1,077 g/ml	Seromed Biochrom, Berlin
Humanes Plasma (FFP; <i>fresh frozen plasma</i>)	BSD Hessen, Frankfurt
Interleukin 2 (IL-2)	Chiron, München
Intraglobin	Biotest, Dreieich
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Linz (Österreich)
X-Vivo 10 ohne Gentamycin und Phenolrot	Cambrex, Verviers (Belgien)

3.1.4 Antikörper und andere Materialien für die Durchflusszytometrie

Einzelne Fluoreszenzantikörper

CD4-FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD69-PE	Immunotech, Krefeld
CD45RO-PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD28-PE	Immunotech, Krefeld
CD25-PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD45-FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD3-PE (Klon UCHT-1)	Beckman Coulter, Krefeld
CD3-PE (Klon SK7)	BD Bioscience, Heidelberg

CD34-PC7	Beckman Coulter, Krefeld
CD3-ECD	Beckman Coulter, Krefeld
CD8-PC5	Beckman Coulter, Krefeld
CD4-PC5	Beckman Coulter, Krefeld
HLA-DR-FITC	Immunotech, Krefeld
CD45RA-FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD45RO-FITC	Immunotech, Krefeld
CD3-FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD34-PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD45-PC7	Beckman Coulter, Krefeld

tetraCHROME (CYT®STAT)

Beckman Coulter, Krefeld

CD45/CD4/CD8/CD3
CD45/CD56/CD19/CD3

IgG-Kontrollen

IgG ₁ -FITC/PE/ECD	Beckman Coulter, Krefeld
IgG ₁ -PC5	Beckman Coulter, Krefeld
IgG ₁ -PC7	Beckman Coulter, Krefeld

iTATM MHC Tetramer-Kit

Beckman Coulter, Krefeld

CD8-FITC
CD4-PE
CD3-PC5
MHC Negativ Tetramer-PE
CMV MHC A0201-PE

DNA-Farbstoff

7AAD	Immunotech, Krefeld
------	---------------------

Zellzahlbestimmung

Flow-Count TM Fluorospheres	Beckman Coulter, Krefeld
--	--------------------------

Kontrolle

ImmunoTrol	Beckman Coulter, Krefeld
------------	--------------------------

Immunomagnetische Selektion

CliniMACS CD3 Reagent
CliniMACS CD4 Reagent
CliniMACS CD8 Reagent
CD3 MicroBeads

Miltenyi Biotec, Begisch Gladbach
Miltenyi Biotec, Begisch Gladbach
Miltenyi Biotec, Begisch Gladbach
Miltenyi Biotec, Begisch Gladbach

T-Lymphozyten Aktivierung

mAb CD3 (Orthoclone OKT3[®])
mAb CD28 (28.2)
T Cell Activation/Expansion Kit

Janssen-Cilag, Neuss
BD Pharmingen, Heidelberg
Miltenyi Biotec, Begisch Gladbach

3.2 Methoden

3.2.1 Ficoll-Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen (MNZ) aus Buffy-Coats sowie aus stimulierten Apheresen wurde eine Ficoll-Separation durchgeführt. Die Buffy-Coats wurden vom Blutspendedienst (BSD) Hessen in Frankfurt bezogen. Die stimulierten Apheresen stellten die verbliebenen Restmengen vom Spender nach Freigabe des Stammzelltransplantats dar, die anonymisiert verwendet wurden. Ein entsprechendes Ethikvotum lag vor.

Bei Ficoll-Trennung werden zwei flüssige Phasen (Zellsuspension und Trennmedium) unterschiedlicher Dichte übereinandergeschichtet und die verschiedenen Zellen abhängig von ihrer Sedimentationsrate aufgetrennt. Als Trennmedium kommt Ficoll-Paque (Biocoll Separating Solution), ein leicht wasserlösliches Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ zur Anwendung.

In einem 50ml-Röhrchen wurden 15 ml Trennmedium vorgelegt und ca. 30 ml der Zellsuspension mit einer Auslaufpipette vorsichtig über das Trennmedium geschichtet. Dabei dürfen die beiden Phasen nicht vermischt werden. Der so hergestellte Ficoll-Gradient wurde zentrifugiert (30 min, 800 g, ohne Bremse).

Nach der Zentrifugation stellen sich vier Phasen dar: als oberste Schicht eine gelbliche Phase (Plasma mit Thrombozyten), eine schmale weißliche Bande (mononukleäre Zellen = Monozyten und Lymphozyten), eine farblose visköse Bande (Ficoll-Trennmedium) und als unterste Phase im Konus des Zentrifugenröhrchens eine rote Schicht (Erythrozyten und Granulozyten).

Die weißliche Bande mit den mononukleären Zellen (MNZ), die zwischen Plasma und Ficollmedium liegt, wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in einem 50ml-Röhrchen gesammelt. Die mononukleären Zellen wurden mit Puffer (PBS+0,5% HSA, 2 mM EDTA) 2x gewaschen. Hierzu wurde das 50ml-Röhrchen bis oben mit Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300 g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet schließlich in 1-5 ml resuspendiert.

3.2.2 Isolierung primärer humaner T-Zellen im Labormaßstab

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der T-Zellen im Labormaßstab dienten Buffy-Coats, die vom BSD Hessen in Frankfurt bezogen wurden.

Immunomagnetische Selektion mittels MACS-Technologie

Zur Aufreinigung wurde das MACS-System von Miltenyi verwendet. Das Prinzip beruht auf einer immunomagnetischen Markierung der Zielzellen. Hierzu werden Eisen-Dextrankolloid-Antikörper verwendet, die an ein bestimmtes Oberflächenmolekül auf den Zielzellen binden. Die markierten Zellen können dann über eine Säule, die sich im magnetischen Feld befindet, getrennt werden. Zunächst wurden ficollisierte MNZ abzentrifugiert und in 80 µl Puffer (PBS+0,5% HSA, 2 mM EDTA) pro 10^7 Zellen resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 10 µl Intraglobin, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach einer Inkubationszeit (5 min, 4°C) wurden 20 µl CD3 MicroBeads (Eisen-Dextrankolloid-Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD3) pro 10^7 Zellen zugegeben und 15 min auf einem Schüttler oder Rotator inkubiert (15 min, 4°C). Parallel wurde eine Selektionssäule (MS^+ für $< 10^7$ markierte Zellen; LS^+ für $> 10^7 < 10^8$ markierte Zellen) mit 500 µl (MS^+) bzw. 3 ml (LS^+) Puffer gespült. Die Zellen müssen von den überschüssigen CD3 MicroBeads durch Waschen befreit werden. Hierzu wurde die Zellsuspension auf das 10-20fache Volumen mit Puffer aufgefüllt und wieder abzentrifugiert (10 min, 300 g). Die Zellen wurden in 0,5 ml (MS^+) bzw. 1-10 ml (LS^+) resuspendiert und auf die Säule aufgetragen, die an einer Magnettafel befestigt war. Die Säule wurde mit 3x 0,5 ml (MS^+) bzw. 3x 3 ml (LS^+) gewaschen, um ungebundene Zellen zu eluieren (Negativfraktion). Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen und auf einen Auffangbehälter platziert, um die Positivfraktion mit 1 ml (MS^+) bzw. 5 ml (LS^+) zu eluieren.

T-Zellaufreinigung mit dem „Human T cell Enrichment Cocktail“ (RosetteSep-Prozedur)

Die RosetteSep-Prozedur basiert auf einer Depletion der unerwünschten Zellen und führt damit zur Anreicherung der gewünschten Zellen. Ein bispezifischer Antikörpercocktail führt zur Bildung eines Tetramer-Immunkomplexes bestehend aus den hämatopoetischen Zellen, die unerwünscht sind (CD16, CD19, CD36, CD56), und Erythrozyten. Dieser Komplex kann anschließend über eine Ficoll-Trennung abgetrennt werden. Es wurde das „Human T cell Enrichment Cocktail“-Kit der Firma StemCell Technologies verwendet und laut Anweisung des Herstellers verfahren. Frisches Vollblut wurde mit 50 µl/ml Antikörper-Cocktail inkubiert (20 min bei RT). Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen Puffer (PBS+0,5% HSA, 2 mM EDTA) verdünnt und eine Ficoll-Trennung durchgeführt (s.o.).

Die RosetteSep-Prozedur bietet den Vorteil, dass die T-Zellen *untouched* bleiben, d.h. es findet keine Markierung mit einem Antikörper statt. Da die aufgereinigten T-Zellen schließlich über CD3 stimuliert werden sollen, ist es besser, wenn das CD3 Antigen sterisch ungehindert bleibt. Ein weiterer Vorteil ist, dass die RosetteSep-Prozedur weniger Zeit in Anspruch nimmt. Der MACS-Selektion muß eine Ficoll-Trennung vorausgehen, während die RosetteSep-Prozedur nach kurzer Inkubation mit dem Antikörpercocktail und einer Ficoll-Trennung schon zum Ergebnis führt.

3.2.3 Isolierung primärer humaner T-Zellen im klinischen Maßstab

Donor-Lymphozyten für die klinische Anwendung sollen aus einer unstimulierten Apherese gewonnen werden. Zum Aufbau des Systems im klinischen Maßstab wurden Buffy-Coats vom BSD Hessen oder die Negativfraktion nach CD34 Selektionen (Abfallbeutel bei der Herstellung von Stammzelltransplantaten) eingesetzt. Mittels eines vollautomatischen CliniMACS Systems können die T-Zellen unter den Bedingungen der *good manufacturing practice* (GMP) über das CD3 Molekül oder alternativ über eine Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 angereichert werden. Das Prinzip der Selektion ist dasselbe wie unter „Immunomagnetische Selektion mittels MACS-Technologie“ beschrieben. Zunächst wurde das sich in einem 500ml-Beutel befindende Apheresat zweimal gewaschen, um die Thrombozytenzahl zu reduzieren. Der Beutel wurde auf ca. 450 ml mit CliniMACS

Puffer (PBS+0,5% HSA, 2 mM EDTA) aufgefüllt und zentrifugiert (Beutelizeutrifuge, 1100 rpm, 15 min, 4°C, Bremse 0, Beschleunigung 8). Dann wurde der Überstand mit einer Beutelpresse in einen leeren Beutel geleitet. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrir wurden die Zellen in einem Volumen von ca. 80-90 ml Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden 5 ml Intraglobin zugegeben, die Leitungen mit 10 ml Puffer gespült und dann 5 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die immunomagnetischen Beads zugeführt. Die Menge richtete sich nach der Ausgangszellzahl im verwendeten Material (Buffy-Coat oder Negativfraktion). In einem Fläschchen CliniMACS CD3 Reagent befinden sich 7,5 ml, die zur Markierung von 15×10^9 CD3 positiven Zellen aus einer Gesamtleukozytenzahl von maximal 40×10^9 Zellen ausreichen. Für die Doppelmarkierung wurden 7,5 ml CD4 CliniMACS Reagent für 12×10^9 CD4⁺ Zellen und 7,5 ml CD8 CliniMACS Reagent per 2×10^9 CD8⁺ Zellen verwendet. Nach Zugabe der Reagents wurde mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt und Luft injiziert, um die Reste aus den Schläuchen zu entfernen. Wenn die Zellzahlen über diesen Werten lagen, wurde ein zweites Fläschchen Reagent verwendet und das Volumen auf ca. 180-190 ml vor Inkubation erhöht. Es folgte eine Inkubationzeit von 30 min bei RT auf dem Schüttler. Im Anschluß wurde der Beutel mit Puffer auf 450 ml aufgefüllt und dann zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrir wurden die Zellen in 150 ml (Gesamtzellzahl $< 40 \times 10^9$) bzw. 300 ml (Gesamtzellzahl $> 40 \times 10^9 < 80 \times 10^9$) Puffer aufgenommen. Die markierten Zellen konnten nun über eine CliniMACS Selektionssäule (Tubing Set LS) angereichert werden. Die Selektion erfolgte über das Programm „Enrichment 1.1“ (Gesamtzellzahl $< 60 \times 10^9$). Der prozentuale Anteil der CD3⁺ T-Zellen sowie die Absolutzellzahl wurden schließlich durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von CD3⁺ T-Zellen in Beuteln

Zum Einfrieren wurden die T-Zellen mit Medium (X-Vivo 10, 20% humanes Plasma, 10% DMSO) auf eine Konzentration von 1×10^7 - 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Dieses zum Einfrieren verwendete Medium wurde vorher auf 4°C vorgekühlt. Der Einfrierprozess wurde mit einer automatisierten Einfrieranlage (Air Liquide) durchgeführt. Die Einfrierereinheit setzt sich aus einer Steuerungseinheit (KRYO 10 SERIES: Controler Model 10-21) und der Probeneinfrierkammer (KRYO 10 SERIES: Chamber Model 10-16) zusammen. Die

Einfrieranlage ermöglichte es, biologisches Material programmiert, d.h. unter Einhaltung einer definierten Gefriereschwindigkeit, einzufrieren. Die sequentielle Abfolge festgelegter Temperaturniveaus wurde durch das kontrollierte Einsprühen von flüssigem Stickstoff erreicht. Der Prozess wurde über einen Temperaturfühler elektronisch überwacht. Wenn die Endtemperatur (-120°C) erreicht wurde, konnten die Proben in Lagerbehälter mit flüssigem Stickstoff (Messer) überführt werden. Die Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) ist zeitlich unbegrenzt. Mit Hilfe einer Steuereinheit wurden die Vorratsbehälter automatisch mit flüssigem Stickstoff versorgt.

Das Auftauen der T-Zellen erfolgte nach einer Standardvorschrift aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III. Der in Stickstoff tiefgefrorene T-Zell-Beutel wurde in einem Auftaugerät (Barkey) aufgetaut. Nach ca. 2 min war die Zellsuspension aufgetaut und es wurden 500 ml einer isotonen NaCl-Heparin-Lösung (10 IE/ml) eingeleitet. Die verdünnte Zellsuspension wurde in einen frischen Beutel überführt und anschließend zentrifugiert (10 min, 460 g, 20°C). Der Überstand wurde abgepresst. Wenn das Präparat Agglomerationen aufwies, wurde 0,5 ml DNase in 5 ml NaCl zugegeben. Die T-Zellen wurden dann mit Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

3.2.5 Aktivierung und Expansion primärer humaner T-Zellen

Aktivierung mit löslichen Antikörpern

Die isolierten T-Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml in X-Vivo 10 (ohne Gentamycin und Phenolrot) + 10% humanes Plasma eingestellt. Die Aktivierung erfolgte mit löslichen Antikörpern gegen CD3 (Orthoclone OKT3) und CD28; CD3 ist der T-Zellrezeptor und CD28 ein Co-Rezeptor. Das Medium war zusätzlich noch mit 1000 U/ml IL-2 versetzt. Für einzelne Versuche wurde die IL-2 Konzentration variiert.

Aktivierung mit auf Beads gebundenen Antikörpern

Zur Aktivierung mit auf Beads gebundenen Antikörpern wurde das „T Cell Activation/Expansion Kit“ der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Beads stellen

synthetische Partikel dar, die antigenpräsentierende Zellen (APC) imitieren sollen. Sie sind mit Streptavidin beschichtet und können entsprechend mit biotinylierten Antikörpern beladen werden. Das Kit enthält CD2, CD3 und CD28 monoklonale Antikörper (mAb). Das Beladen der Beads mit Antikörpern sowie die Stimulierung erfolgten nach Anweisung des Herstellers. Zum Beladen der Beads wurden die Antikörper (je 100 µl) in ein 2ml-Kryo-Röhrchen vorpipettiert. Die Beads-Suspension wurde gevortext und 500 µl in das Kryo-Röhrchen überführt (entspricht 10^8 Beads). Es wurde mit Puffer (PBS+0,5% HSA, 2 mM EDTA) auf 1 ml aufgefüllt und die Mischung 2 h auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. Die Beads waren nun beladen und konnten 4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Vor Gebrauch wurden die überschüssigen Antikörper durch einen Waschschrift entfernt.

Die Aktivierung der T-Zellen fand in einem Bead/Zell-Verhältnis von 1:2 statt. Die T-Zellen wurden auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellt und mit der entsprechenden Menge an Beads versetzt. Sollten MNZ statt aufgereinigter T-Zellen stimuliert werden, wurde eine Konzentration von 5×10^6 /ml verwendet, wobei die Anzahl der Beads angepasst werden musste. Laut Anweisung des Herstellers wurden die stimulierten T-Zellen an Tag 3, 7 und 11 zusätzlich mit 20 U/ml IL-2 versetzt. Alternativ wurde das Medium mit 20, 100 oder 1000 U/ml IL-2 versetzt.

Expansion der T-Zellen

Die aktivierten T-Zellen wurden in Flaschen und Beuteln über 14 Tage expandiert. Der Tag der CD3 Selektion und Inkulturnahme wurde als Tag 0 bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl sowie des Immunstatus erfolgte alle 2-3 Tage. Die Expansion antigenspezifischer T-Zellen wurde nur 1-2x pro Woche gemessen. Ggf. transduziert wurde an den Tagen 3 und 4. Die Messungen nach Transduktion wurden an Tag 7 durchgeführt.

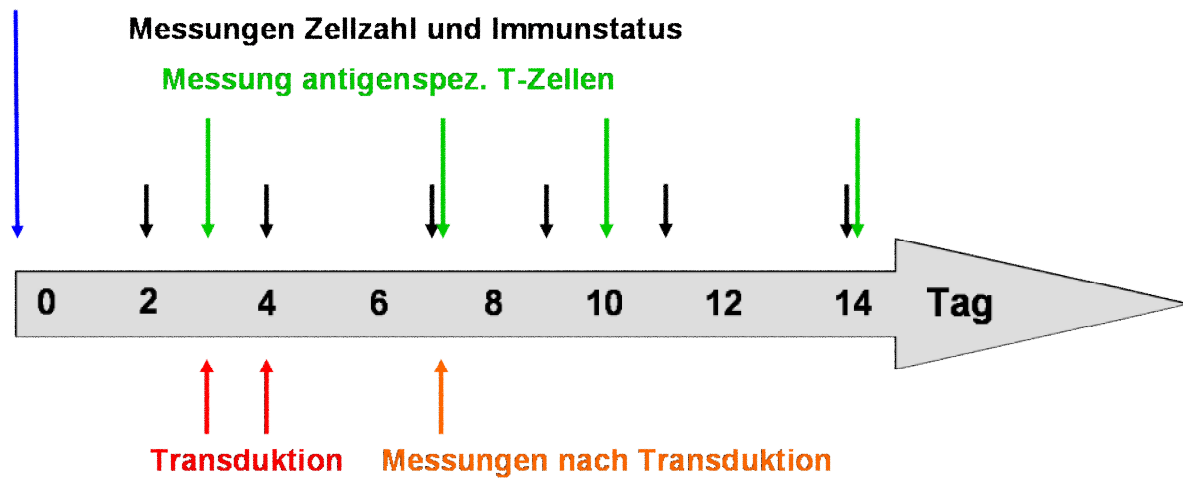
Inkulturnahme

Abbildung 3.1 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

3.2.6 Durchflusszytometrische Messungen

In der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer Größe (*forward scatter*; FS) und Granularität (*side scatter*; SS) charakterisiert werden. Außerdem lassen sich Zelloberflächenmoleküle durch spezifische Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, nachweisen. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute (aufgrund Größe und Granularität) als auch das emittierte (aufgrund der Fluoreszenzfarbstoffe) Licht. Die Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können simultan in einer Analyse eingesetzt werden, so dass eine nähere Charakterisierung der Zellen möglich wird. Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet:

1. Fluoreszenz: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
2. Fluoreszenz: Phycoerythrin (PE)
3. Fluoreszenz: Phycoerythrin-Texas Rot (ECD)
4. Fluoreszenz: Phycoerythrin-Cyanine 5 (PC-5)
5. Fluoreszenz: Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC-7)

Alle Messungen fanden am 5-Farbdurchflusszytometer FC 500 (Beckman Coulter) statt.

3.2.6.1 Bestimmung der CD3⁺ T-Zellen als „single-platform“-Analyse

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl der CD3⁺ T-Zellen wurde folgende Analyse durchgeführt:

10 µl CD45-FITC

10 µl CD3-PE

20 µl 7AAD wurden in einem Polypropylen-Röhrchen vorpipettiert.

Zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde ein weiteres Röhrchen mit 10µl CD45-FITC/Control-PE (kombinierter Antikörper) vorgelegt.

Durch die gleichzeitige Färbung mit dem Antikörper CD3 und 7AAD konnte die Vitalität der T-Zellen in einem Ansatz bestimmt werden. 7AAD ist ein DNA-Farbstoff, der die Zellmembran gesunder Zellen nicht überwinden kann. Werden die Zellen nekrotisch und deren Membran durchlässig, dringt 7AAD in das Zytoplasma ein und interkaliert mit der DNA. Zellen, die 7AAD aufgenommen haben, können im 3. Fluoreszenzkanal detektiert werden. In der Auswertung wurden mit Hilfe der 7AAD-Färbung nur die lebenden Zellen (7AAD negative Zellen) in die Zellzählung eingeschlossen (=„single-platform“).

Es wurden 100 µl Probe (entsprach $1-2,5 \times 10^5$ Zellen) zugegeben. Hierzu wurde die reverse Pipettiertechnik angewandt. Ein exaktes Pipettieren ist sehr wichtig für das Arbeiten mit Zählbeads (Flow-Count™ Fluorospheres). Außerdem wurden flüssige Reste am Außenrand der Pipettenspitze mit einem Tuch vorsichtig abgewischt. Die Ansätze wurden gevortext, um eine optimale Durchmischung zu erreichen, und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zur Zellzahlbestimmung wurden Flow-Count™ Fluorospheres als interner Standard verwendet. Die Zählbeads wurden zunächst gevortext und dann 10 min im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt, so dass entstandene Bläschen entweichen konnten. Anschließend wurde das Fläschchen noch kurz geschwenkt und 100 µl der Flow-Count™ Fluorospheres revers in das Probenröhrchen pipettiert. Flüssige Reste am Außenrand der Pipettenspitze wurden zuvor entfernt. Dann wurde gevortext und innerhalb der nächsten 5 min gemessen.

Zur Bestimmung der CD3⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer wurde folgende „Gating“-Strategie verfolgt:

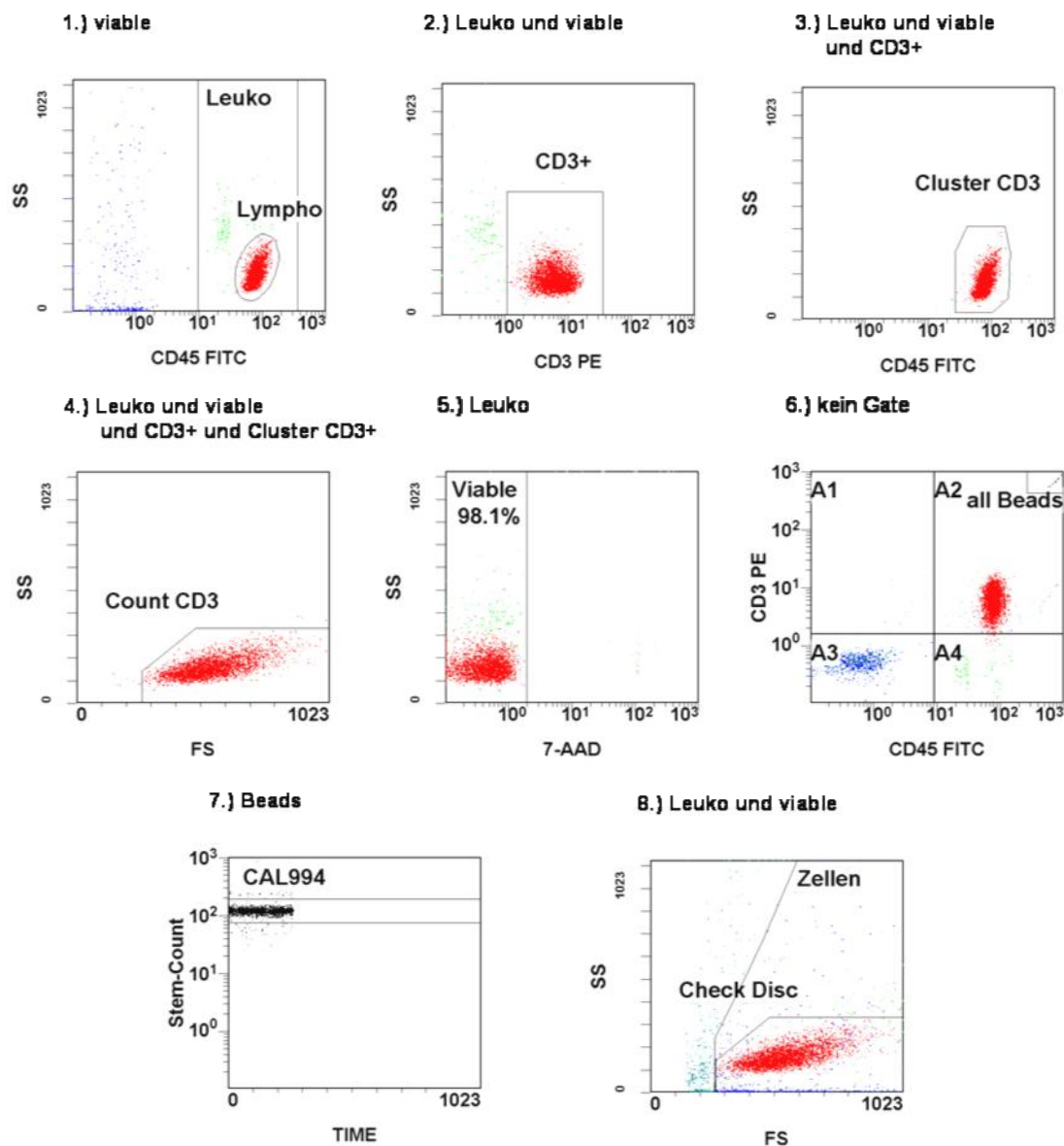


Abbildung 3.2 Die „Gating“-Strategie zur Bestimmung der $CD3^+$ T-Zellen im Durchflusszytometer. Über jedem Diagramm (dot plot) ist angegeben, auf welche Zellpopulation gated wurde. Für die $CD45^+$ Leukozyten wurde die Abkürzung Leuko verwendet. Es wird nur die Zellpopulation dargestellt, die vorher über ein „Gate“ definiert wurde. Kombinierte Gates bilden eine Schnittmenge. In Diagramm 1.) werden nur die lebenden Zellen aus dem Gate viable in Diagramm 5.) dargestellt. Im nächsten Diagramm wird auf die lebenden Leukozyten gated (kombiniertes Gate) und gegen CD3 dargestellt. In Diagramm 3.) werden die $CD3^+$ Zellen noch einmal gegen CD45 aufgetragen, um potentielle Monozyten aus der Analyse zu eliminieren. Die Monozyten können den CD3 Antikörper auch unspezifisch binden, erscheinen dann aber nur $CD45^+$ dim (d.h. weiter links im Diagramm). In Diagramm 4.) wird die Zellzahl der $CD3^+$ T-Zellen abgelesen. Diagramm 6.) ist ungated (ohne Gate; alle Zellen werden dargestellt). Es wird ein Gate für die Zählbeads gesetzt, um diese dann in Diagramm 7.) im Zeitverlauf darzustellen. Diagramm 8.) ist eine Übersicht der lebenden Leukozyten im FS (*forward scatter*) und SS (*side scatter*).

3.2.6.2 Bestimmung der CD34⁺ Stammzellen

Die CD34⁺ Stammzellen wurden mit derselben „single-platform“-Analyse bestimmt wie die CD3⁺ T-Zellen. Abweichend von der Analyse der T-Zellen wurde statt CD3-PE der Antikörper CD34-PE eingesetzt.

3.2.6.3 Bestimmung des Immunstatus primärer humaner T-Zellen

Die Lymphozytensubpopulationen können aufgrund der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker charakterisiert werden. Hierzu kommen die kombinierten Antikörper tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 und tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 sowie andere einzeln eingesetzte monoklonale Antikörper zum Einsatz. Zur Markierung der Zellen wurde folgendes Panel von Antikörperkombinationen in 10 verschiedene Röhrchen vorpipettiert.

Tabelle 3.1 Pipettierschema zur Bestimmung eines großen Immunstatus.

Röhrchen Nr.	Antikörpersuspension	Antikörpermenge [µl]	Probenmenge [µl]	Bemerkungen
1	tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/ CD8-ECD/CD3-PC5	10	100	Messung der T-Zellsubpopulationen
2	tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/ CD19-ECD/CD3-PC5	10	100	Messung der Lymphozyten,- B-Zell und NK-Zellpopulationen
3	IgG-FITC/IgG-PE/IgG-ECD/IgG-PC5	Jeweils 5	100	dient zur Kontrolle
4	HLA-DR-FITC / CD69-PE/CD3-ECD/ CD4-PC5	Jeweils 5	100	Messung der früh aktivierten T4-Zellen
5	HLA-DR-FITC/ CD69- PE/CD3-ECD/ CD8-PC5	Jeweils 5	100	Messung der früh aktivierten T8-Zellen
6	CD45RA-FITC/ CD45RO-PE/CD3-ECD/CD4-PC5	Jeweils 5	100	Messung der naiven und Gedächtnis-T4-Zellen

7	CD45RA-FITC/ CD28-PE/CD3-ECD/ CD8-PC5	Jeweils 5	100	Messung der naiven und Effektor-T8-Zellen
8	---/CD45RO-PE/CD3- ECD/CD8-PC5	Jeweils 5	100	Messung der Gedächtnis-T8-Zellen
9	---/CD25-PE/CD3- ECD/CD4-PC5	Jeweils 5	100	Messung der regulatorische T4-Zellen
10	CD45-FITC/CD14-PE	Jeweils 10	100	Messung der Monozytenpopulation

Für die Bestimmung des Immunstatus nach Transduktion wurde zu jeder Analyse zusätzlich CD34-PC7 pipettiert, um transduzierte Zellen zu identifizieren.

Die Ansätze wurden gevortext, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Dann wurden sie 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die Messung erfolgte in festgelegten Protokollen, denen eine „Gating“-Strategie zugrunde liegt. Für die ersten beiden tetraCHROME Analysen, die Kontrolle und Analyse 10 zur Bestimmung der Monozytenkontamination wurde auf Leukozyten gated. Für die übrigen Analysen wurde auf Leukozyten und CD3⁺ gated bzw. für die jeweiligen Subpopulationen zusätzlich auf CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺.

3.2.6.4 Bestimmung CMV-spezifischer CD3⁺CD8⁺ T-Zellen

Die Bestimmung CMV-spezifischer T-Zellen erfolgte aus der Zellkultur frisch isolierter T-Zellen CMV- und HLA-A0201-positiver Spender. Hierzu wurde das „iTag MHC Tetramer“-Kit der Firma Beckman Coulter verwendet. Die Tetramer-Technologie ermöglicht es, antigenspezifische T-Zellen nachzuweisen. Das fremde Antigen allein lässt sich nicht verwenden, da T-Zellen Antigene nur als Komplex aus Peptidfragmenten des Antigens und körpereigenen MHC-Molekülen erkennen. Die Affinität der Wechselwirkung zwischen T-Zellrezeptor und MHC:Peptid-Komplex ist jedoch zu gering, um antigenspezifische T-Zellen zu markieren. So wurden MHC:Peptid-Tetramere entwickelt und damit die Avidität der Wechselwirkung erhöht. Die mit dem Antigenpeptid beladenen, rekombinanten MHC-Moleküle werden aufgrund einer spezifischen Aminosäuresequenz biotinyliert. Mischt man die biotinylierten MHC-Moleküle mit Streptavidin, bilden sich Tetramere, da Streptavidin

vier Bereiche aufweist, die eine feste Bindung mit Biotin eingehen. Das Streptavidin ist darüber hinaus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Es stehen nun vier Bindungspartner in einem Komplex zum Nachweis einer T-Zelle zur Verfügung. Zum Nachweis CMV-spezifischer T-Zellen sind die rekombinanten MHC-Moleküle mit dem Peptid pp65 des Cytomegalovirus beladen. Das Protokoll des Herstellers beschreibt eine Zwei-Panel-Technik: Im ersten Panel wird die Absolutzahl der $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen mit Hilfe von Flow-Count™ Fluorospheres bestimmt. Im zweiten Panel werden die CMV-spezifischen $CD3^+CD8^+$ T-Zellen prozentual bestimmt. So wird schließlich die absolute Zahl der antigenspezifischen $CD3^+CD8^+$ T-Zellen/ μ l errechnet, indem man die Prozentzahl aus dem zweiten Panel auf den gemessenen Absolutwert der $CD3^+CD8^+$ Zellen aus dem ersten Panel umrechnet. Zur praktischen Vorgehensweise in Kürze: Im 1. Panel wurden folgende Antikörper in ein Polypropylen-Röhrchen pro Analyse vorpipettiert und mit 100 μ l Probe versetzt: CD8-FITC, CD4-PE, CD3-PC5 und CD45-PC7. Die Ansätze wurden gevortext und 20-30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurde 1 ml/Ansatz Lyse-Fix-Reagenz (25 μ l Fixative Reagenz/ml Lyse Reagenz) zugegeben, gevortext und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im 2. Panel wurden dieselben Antikörper wie im 1. Panel pipettiert, anstatt CD4-PE jedoch der entsprechende PE-markierte MHC:Peptid-Komplex (HLA-A0201) verwendet und 200 μ l Probe zugegeben. Nach Inkubation (20-30 min bei RT im Dunkeln) wurden 2 ml Lyse-Fix-Reagenz pipettiert und wieder inkubiert (10 min, RT, dunkel). Anschließend wurde abzentrifugiert (150 g, 10 min) und der Überstand verworfen. Es wurde mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Es wurden 500 μ l Formaldehyd-PBS (0,1%) zugegeben. Anschließend wurde mindestens 1 h inkubiert (4°C im Dunkeln). Die Proben aus dem 1. und 2. Panel konnten bis zu 24 h gelagert werden (4°C im Dunkeln). Die Messungen erfolgten schließlich am Durchflusszytometer. Das erste Panel zur Bestimmung der Absolutzellzahl wurde über eine ähnliche „Gating“-Strategie gemessen wie in Abbildung 3.2 beschrieben. Allerdings wurde hier nicht auf die lebenden Zellen gated, da kein Totfarbstoff zur Identifizierung in der Analyse vorhanden war. Außerdem wurde zusätzlich die Zahl der $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen bestimmt. Im zweiten Panel wurde der prozentuale Anteil der $CD3^+CD8^+$ Tetramer⁺ Zellen über das Gating von Leukozyten ($CD45^+$) und T-Zellen ($CD3^+$) bestimmt.

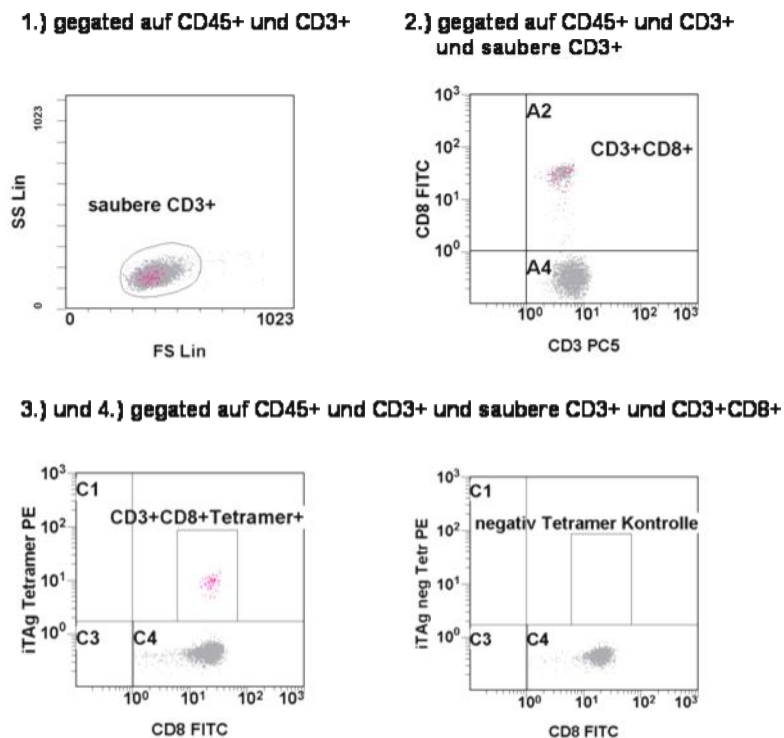


Abbildung 3.3 Bestimmung CMV-spezifischer CD3⁺CD8⁺ T-Zellen mittels der Tetramer Technologie. Dargestellt ist die „Gating“-Strategie für das zweite Panel. Das Diagramm 1.) zeigt die sauberen CD3⁺ im FS und SS. Sie sind gated auf CD45⁺ Leukozyten und CD3⁺ T-Zellen. In Diagramm 2.) werden die CD3⁺CD8⁺ T-Zellen in dem Quadranten A2 dargestellt, auf den die Diagramme 3.) und 4.) gated sind. Diagramm 3.) zeigt die CMV-spezifischen CD3⁺CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen. Diagramm 4.) zeigt die Negativkontrolle. Da keine Zählbeads (Flow-Count™ Fluorospheres) im zweiten Panel verwendet wurden, konnten nur die prozentualen Werte ermittelt werden. Mit Hilfe der Analyse aus dem ersten Panel konnte schließlich auf die Absolutzahl CMV-spezifischer T-Zellen umgerechnet werden.

3.2.7 Untersuchung der Zytokinausschüttung unter Stimulierung mittels Cytometric Bead Array

Die Messung der Zytokine erfolgte mit dem Cytometric Bead Array (CBA) von BD Bioscience. Die Technologie wird auch als *multiplex bead array* bezeichnet, da in einer Analyse theoretisch bis zu 70 verschiedene Zytokine bestimmt und quantifiziert werden können. Der Hersteller stellt eine Serie farblich verschiedener Beads zur Verfügung, wobei jede kleine Kugel für ein bestimmtes Zytokin spezifisch ist. Die Spezifität wird über

zytokinspezifische Antikörper, die auf der Oberfläche gebunden sind, erreicht. Ist ein entsprechendes Zytokin in der Probe vorhanden, kann es über den Spektralbereich des Beads von einem Laser bestimmt werden. Im nächsten Schritt wird das Zytokin über einen fluoreszierenden (zweiten) Antikörper quantifiziert (Sandwich-Prinzip). Mittels der Fluoreszenzintensität und einer Standardkurve wird die Konzentration des Zytokins in der Probe errechnet. Um zu untersuchen, ob es eine Begünstigung des Th₁- oder Th₂-Zweiges unter Stimulierung gibt, wurde das „Human Th1/Th2 Cytokine Kit II“ verwendet. Das Kit eignet sich zur Detektion von den Th₁-Zytokinen IL-2, IFN- γ , TNF- α und den Th₂-Zytokinen IL-4, IL-6, IL-10. Die Anwendung erfolgte laut Anweisung des Herstellers. Zunächst musste die Standardreihe hergestellt werden: Der gefriergetrocknete Standard wurde in 200 μ l mitgeliefertem „Assay Diluent“ durch Schwenken gelöst. In 10 Polystyrol-Röhrchen wurden 1x 900 μ l und 9x 300 μ l Assay Diluent vorgelegt. In das erste Röhrchen wurden 100 μ l Standardlösung hinzugegeben, daraus dann 300 μ l entnommen und in das nächste Röhrchen pipettiert. Die Verdünnungsreihe wurde entsprechend fortgesetzt, so dass sich folgende Verdünnungen für jedes Zytokin ergaben: 0, 20, 40, 80, 156, 312, 625, 1250, 2500 und 5000 pg/ml. Im Anschluß wurde die Mischung der zytokinspezifischen kleinen Kügelchen, sogenannte „Capture Beads“, hergestellt. Pro Probe wurden 10 μ l des „Capture Beads“-Mix in einen 14ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (200 g, 5 min, 20°C). Der Überstand wurde verworfen und die Beads im mitgelieferten „Serum Enhancement Buffer“ resuspendiert. Schließlich wurde eine 96-Lochplatte für die Messung vorbereitet. Es wurden je 50 μ l der Standardverdünnung und der Proben aufgetragen. In jedes Loch wurden dann 50 μ l „Capture Beads“ pipettiert, und die Platte 5 min auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in ruhendem Zustand (1 h, RT, im Dunkeln). Nach dieser Inkubationsperiode wurden 50 μ l „PE Detection Reagent“ pro Loch zugegeben und 5 min wie oben geschüttelt, dann 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Am Ende erfolgte ein Waschschriff, um den überschüssigen Zweitantikörper zu entfernen. Hierzu wurde die Platte zentrifugiert (200 g, 5 min, 20°C), der Überstand abgenommen und die Löcher mit 150 μ l „Wash Buffer“ aufgefüllt. Die Platte wurde anschließend mit dem BD FACSArray Bioanalyser vermessen.

3.2.8 Transduktion primärer humaner T-Zellen

Die Transduktion humaner primärer T-Zellen wurde an Tag 3 und 4 in Zellkulturflaschen durchgeführt. Die selektierten CD3⁺ T-Zellen wurden mit X-Vivo 10 + 10% humanem Plasma (supplementiert mit den löslichen Antikörpern anti-CD3 und -CD28 + 1000 U/ml IL-2 oder stimuliert mit anti-CD2, -CD3 und -CD28 beladenen Beads + 20 U/ml IL-2) und Virusüberstand auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt, so dass sich eine theoretische Infektionsquote von 2 ergab (*multiplicity of infection*; MOI=2). Die so vorbereiteten T-Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt und zur Transduktion zentrifugiert (90 min, 2500 rpm, 32°C). Anschließend wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am darauffolgenden Tag wurde die Transduktion wiederholt. Hierzu wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert und in frischem Medium und Virusüberstand resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen für weitere 2,5 h im Brutschrank inkubiert und dann in frisches Medium gesetzt. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD34 im Durchflusszytometer bestimmt.

3.2.8.1 Retrovirale Vektoren

Die Transduktionen wurden zum einen mit dem Vektor M71tCD34TK39mw durchgeführt. Dieser Vektor ist eine Weiterentwicklung des bereits in der Literatur beschriebenen Vektors MtCD34TK39mw (Junker, *et al.* 2003). Es wurde lediglich der Leader ausgetauscht, um eine bessere Expression des Transgens zu erzielen. Der neue Leader ist ebenso bereits in der Literatur beschrieben worden (Hildinger, *et al.* 1999).

Zum anderen wurden die Transduktionen mit dem Vektor MP71-T34FT durchgeführt, der für die klinische Anwendung entwickelt wurde. Die von uns verwendeten Virusüberstände wurden unter den GMP Bedingungen hergestellt und sind uns freundlicherweise von der Firma EUFETS, einer Tochtergesellschaft der Freseniusgruppe, zur Verfügung gestellt worden.

Beide Vektorsysteme basieren auf einem retroviralen *Backbone* vom Molony-Typ und enthalten ein artifizielles Intron, den Leader 71. Das Transgen codiert für ein Fusionsprotein, das aus einer natürlichen Spleißvariante des CD34-Oberflächenmoleküls, tCD34, und der Thymidinkinase (TK) des Herpes-Simplex-Virus I (HSV I) besteht. In dem erst genannten

Vektor befindet sich eine Ganciclovir hypersensitive Variante der Thymidinkinase (TK39) (Black, *et al.* 2001). In dem anderen Vektor wurde eine spleißkorrigierte Variante des Wildtyps kloniert (TK). Die Expression des Oberflächenmarkers CD34 auf den transduzierten Zellen erlaubt eine immunomagnetische Selektion zur Anreicherung. Die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus ermöglicht den gezielten Suizid transduzierter Zellen. Die viralen Partikel wurden mit dem Glycoproteins des *gibbon ape leukemia virus* (GALV) pseudotypisiert.

Die Vektorkarten befinden sich im Anhang (S.124).

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung primärer humaner T-Zellen

Aus Sicherheitsgründen sollten nur T-Zellen transduziert werden. Im peripheren Blut befindet sich jedoch auch ein kleiner Anteil hämatopoetischer Stammzellen (Becker 2005), die sich durch eine Ficoll-Separation nicht abtrennen lassen. Deswegen wurden die T-Zellen zunächst im Labormaßstab aufgereinigt. Nach der Selektion wurde die Reinheit der $CD3^+$ T-Zellen bestimmt.

4.1.1 Selektion der $CD3^+$ T-Zellen im Labormaßstab

Zur Anreicherung der $CD3^+$ T-Zellen im kleinen Maßstab wurden zwei Methoden getestet: Die immunomagnetische Selektion mit der MACS-Technologie und die RosetteSep-Prozedur, bei der die unerwünschten Zellen depletiert werden. Im Vollblut der gesunden Spender ($n=14$) befanden sich durchschnittlich $1,8 \times 10^6/\text{ml}$ T-Zellen. Mittels der MACS-Technologie konnte eine mittlere Ausbeute von 62,9% erzielt werden. Die Reinheit betrug 98,3% ($n=5$). Bei der RosetteSep-Prozedur war die Ausbeute mit 46,2% deutlich niedriger. Die mittlere Reinheit der T-Zellen war jedoch vergleichbar und betrug 97,4% ($n=9$). Unabhängig von der Methode war die Monozytenkontamination $< 1\%$, wobei die verbliebenen Monozyten unter Expansion verloren gingen. Bestehende Verunreinigungen waren auf restliche Granulozyten zurückzuführen, die ebenso unter Expansion verschwanden.

4.1.2 Selektion der $CD3^+$ T-Zellen im klinischen Maßstab

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung der $CD3^+$ T-Lymphozyten mittels des CliniMACS Systems im klinischen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden kann. Die RosetteSep-Prozedur ist für die klinische Anwendung nicht geeignet.

Zum einen wurden die T-Zellen über CD3 aufgereinigt. Um das CD3 Molekül der T-Zellen *untouched* zu lassen, wurde außerdem eine Selektion über CD4/CD8 durchgeführt.

Die Reinheit der CD3⁺ Zellen lag im Bereich von 92,9 bis 99,8%. Zwischen der CD3 und CD4/CD8 Selektion bestand hierbei kein Unterschied (Tabelle 4.1 A. und B.).

Tabelle 4.1 Selektion mit dem CliniMACS.

A. Es wurde zur Aufreinigung das CD3 Reagent verwendet.

Als Ausgangsmaterial diente die Negativfraktion aus CD34 Selektionen für Patiententransplantate.

SD=Standardabweichung

Selektion	Anteil CD3⁺ Zellen				
Nr.	vor Selektion [%]	nach Selektion [%]	absolut [x10⁹]	Ausbeute [%]	Vitalität [%]
1	68,5	93,0	4,5	53,0	95,0
2	60,1	92,9	6,2	62,0	97,0
3	67,2	96,8	3,4	58,0	92,4
4	57,7	97,7	3,1	49,0	97,0
5	67,7	99,3	4,2	71,0	91,8
6	59,7	97,4	2,5	44,0	96,0
7	63,3	98,2	4,4	55,0	97,8
8	68,1	93,6	2,1	49,7	95,4
9	60,6	99,8	3,1	57,0	93,1
Mittelwert	63,7	96,5	3,7	55,4	95,1
SD	4,3	2,7	1,2	7,9	2,2

B. Zur Aufreinigung wurden das CD4 und das CD8 Reagent kombiniert eingesetzt.

Selektion	Anteil der CD3⁺ Zellen				
Nr.	vor Selektion [%]	nach Selektion [%]	absolut [x10⁹]	Ausbeute [%]	Vitalität [%]
1	64,3	97,0	6,5	64,0	97,0
2	53,8	95,6	8,4	74,0	92,0
3	52,7	93,1	4,3	55,0	94,0
4	56,9	97,5	3,9	62,0	94,0
5	64,2	98,2	2,5	41,0	95,0
6	66,5	95,8	7,0	69,0	99,0
7	58,4	98,4	7,4	79,0	93,6
Mittelwert	59,5	96,5	5,7	63,4	94,9
SD	5,5	1,9	2,1	12,7	2,3

In Abbildung 4.1 sind zwei Analysen von einer Selektion über das Oberflächenantigen CD3 dargestellt (Reinheit 93,0%). Die erste Analyse (A.) wurde mit dem herkömmlichen Fluoreszenzantikörper CD3-PE durchgeführt, wobei der Antikörper vom Klon UCHT-1

stammt. Für die Analyse B. wurde ein neuer Fluoreszenzantikörper verwendet, der von einem anderen Klon produziert wurde (SK7).

Da der erste Antikörper an dasselbe Epitop bindet wie der immunomagnetische Antikörper aus dem CD3 Reagent, kommt es zu einer sterischen Hinderung: Der Eisen-Dextran-Kolloid Antikörper ist schon gebunden und dem Fluoreszenz gekoppelten Antikörper verbleiben nur noch die restlichen Bindungsstellen.

Hierdurch erschien die $CD3^+$ Wolke im Durchflusszytometer mit einer geringeren Fluoreszenzintensität als bei unselektierten T-Zellen. Von großem Nachteil war, dass sich die T-Zellen dadurch schlechter von der Negativpopulation trennen ließen und die Analyse ungenau wurde. Im Gegensatz dazu war die Trennlinie zwischen CD3 positiven und negativen Zellen in der Analyse mit dem neuen Klon wesentlich einfacher zu ziehen.

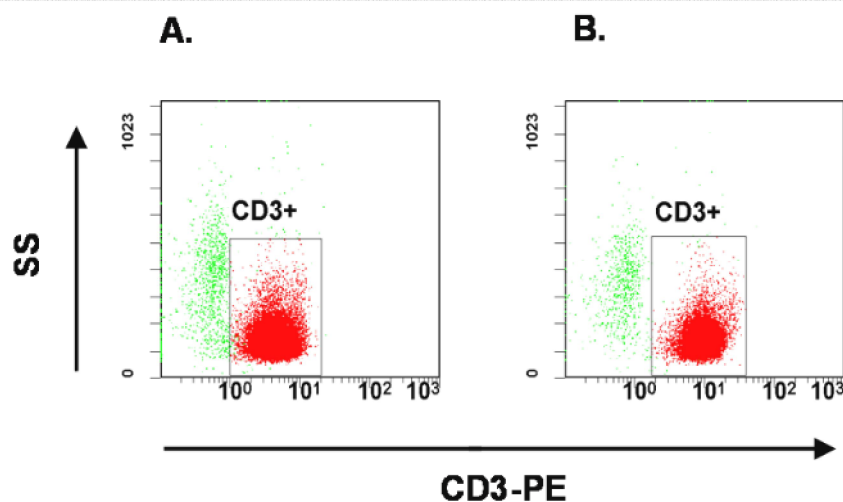


Abbildung 4.1 Eine durchflusszytometrische Analyse nach der T-Zellisolierung über das CD3 Oberflächenantigen. Für Analyse A. wurde ein Fluoreszenzantikörper (UCHT-1) verwendet, der an dasselbe Epitop bindet wie der Antikörper zur Selektion. Die Trennung der $CD3^+$ Zellen von der Negativfraktion war nur ungenau vorzunehmen, während in Analyse B. mit einem anderen Antikörper (SK7) die Trennlinie eindeutig wurde. SS=Side Scatter (=Granularität). Die ausführliche Beschreibung der „Gating“-Strategie befindet sich im Methodenteil (3.2.5.1 und Abbildung 3.2).

Die Ausgangszellzahl der $CD3^+$ T-Zellen lag im Bereich $4,3-12,4 \times 10^9$ Zellen. Bei einer mittleren Ausbeute von 55,4% konnten mit der Aufreinigung über CD3 $2,1-6,2 \times 10^9$ $CD3^+$ T-Zellen isoliert werden. Die Aufreinigung über die Epitope CD4 und CD8 erzielte eine mittlere Ausbeute von 63,4%. Die Absolutzellzahl schwankte zwischen $2,5-8,4 \times 10^9$. Die Vitalität der

CD3⁺ Zellen nach Selektion lag unabhängig von der Wahl der Antikörper zwischen 91,8% und 99%. (Tabelle 4.1).

Der prozentuale Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde durch die Selektion nicht beeinflusst. Nach Selektion lag der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchschnittlich bei 59,1% bzw. 37,98% (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis dieser Populationen liegt im physiologischen Bereich (Bisset, *et al.* 2004).

Die Verunreinigungen durch B- und/oder NK-Zellen war gering: Im Durchschnitt ließen sich nur noch 0,35% CD3⁻CD19⁺ B-Zellen und 0,23% CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen nachweisen. Die größte Verunreinigung wurde durch Monozyten verursacht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit Hinblick auf Effizienz und Reinheit zwischen der Aufreinigung über CD3 und der Aufreinigung über CD4/CD8 keinen Unterschied gibt. Da die Aufreinigung über CD4/CD8 das CD3 Epitop der T-Zellen *untouched* lässt, ist diese Methode vorzuziehen. So können mögliche Wirkungen und Folgen eines an CD3 gebundenen Antikörpers von Beginn an ausgeschlossen werden.

4.2 Aktivierung und Expansion primärer humaner T-Zellen

Nach Isolierung sollten die T-Zellen in Kultur genommen und stimuliert werden. Zur Aktivierung standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. In den ersten klinischen Studien wurden PHA oder ein Antikörper gegen CD3 (Orthoclone OKT3) in Kombination mit IL-2 zur Aktivierung verwendet. Jedoch zeigte sich, dass diese Art der Stimulierung die immunologische Kompetenz der Zellen stark einschränkt.

Zusätzlich zur Aktivierung des T-Zellrezeptors über CD3 können auch Co-Rezeptoren stimuliert werden. Exogenes IL-2 fördert die Proliferation der T-Zellen, wobei in einem großen Konzentrationsbereich (10-1000 U/ml) gearbeitet werden kann.

4.2.2 Aktivierung primärer humaner T-Zellen mittels löslicher Antikörper und IL-2

Zum einen sollte ein Protokoll zur Stimulierung etabliert werden, das sich an vorhandene Protokolle zur T-Zellaktivierung anlehnt. Eine Literaturrecherche ergab, dass fast immer CD3 mAb (Orthoclone OKT3) in einer Konzentration zwischen 10 ng und 5 µg/ml eingesetzt wurde (Hedfors, *et al.* 2005, Junker, *et al.* 2003, Marktel, *et al.* 2003, Qasim, *et al.* 2003, Sauce, *et al.* 2002, Sauce, *et al.* 2003, Serafini, *et al.* 2004, Thomis, *et al.* 2001, Tiberghien, *et al.* 2001). Teilweise wurde ein Antikörper gegen CD28 zur Co-Stimulation eingesetzt. Die Konzentration variierte zwischen 100 ng und 1µg/ml. IL-2 wurde in jedem Protokoll verwendet, jedoch in sehr unterschiedlichen Konzentrationen (10-1000 U/ml).

Die T-Zellen sollten nicht übermäßig stimuliert werden, aber trotzdem ihre Vitalität über 14 Tage erhalten. Eine ausschließliche Aktivierung über CD3 fördert den aktivierungsinduzierten Zelltod (*activation induced cell death*; AICD). Um den AICD gering zu halten, wurde eine niedrige Konzentration von 20 ng Orthoclone OKT3 bei gleichzeitiger Stimulierung des Co-Rezeptors CD28 gewählt. Insbesondere die Co-Stimulation soll den AICD einschränken. Es wurden die beiden Konzentrationen 100 ng und 1 µg in Hinblick auf die Vitalität der T-Zellen getestet.

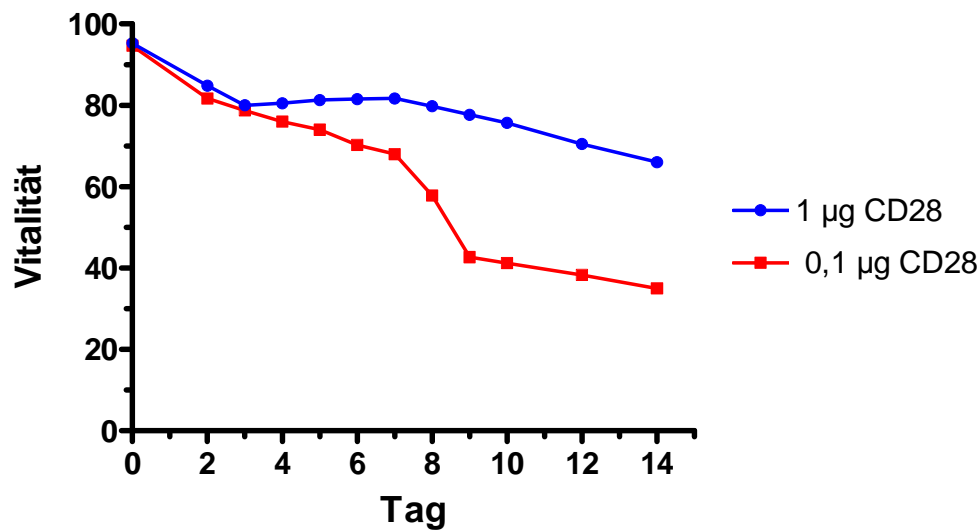


Abbildung 4.2 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen des mAb CD28 zur T-Zellaktivierung. CD3 selektierte humane primäre T-Zellen wurden in Kultur genommen und mit 20 ng Orthoclone OKT3, 1000 U/ml IL-2 + 0,1 µg mAb CD28 (—) bzw. + 1µg mAb CD28 (—) stimuliert. Die Vitalität stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar (SD 3-40%).

Wie aus der Abbildung 4.2 zu erkennen ist, zeigten die T-Zellen beim Einsatz der höheren Konzentration des Antikörpers gegen den Co-Rezeptor CD28 deutlich mehr Vitalität.

Im nächsten Schritt wurde die IL-2 Konzentration um den Faktor 10 auf 100 U/ml gesenkt, während die hohe Konzentration des mAb CD28 (1 µg/ml) beibehalten wurde.

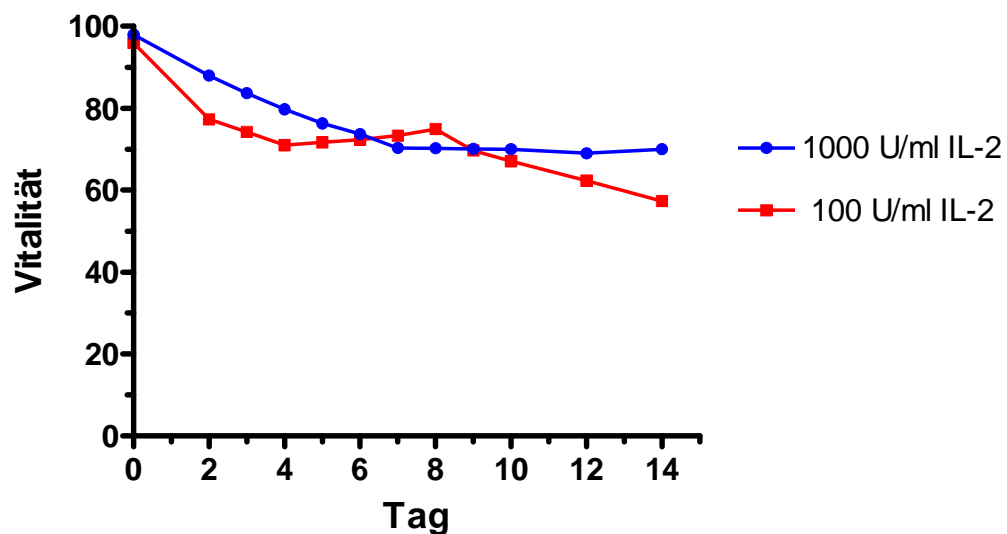


Abbildung 4.3 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen des Zytokins IL-2 zur T-Zellaktivierung. CD3 selektierte humane primäre T-Zellen wurden in Kultur genommen und mit 20 ng Orthoclone OKT3, 1 µg mAb CD28 + 100 U/ml (—) bzw. + 1000 U/ml IL-2 (—) stimuliert. Die Vitalität stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar (SD 1-20%).

Da die höhere IL-2 Konzentration zu einer besseren Vitalität der T-Zellen beitrug, wurde das Protokoll mit den löslichen Antikörpern auf folgende Konzentrationen festgelegt:

Tabelle 4.2 Aktivierungsprotokoll mit löslichen Antikörpern. HP = humanes Plasma (FFP; *fresh frozen plasma*)

Protokoll	Lösl. mAb + 1000 U/ml IL-2
Medium	X-Vivo 10
Zusätze	10% HP
Aktivierung	20 ng/ml Orthoclone OKT3 1 µg/ml mAb CD28 1000 U/ml IL-2

4.2.3 Aktivierung primärer humaner T-Zellen mittels auf Beads gekoppelter Antikörper und IL-2

Die Beads sind kleine synthetische Kügelchen, die ungefähr die Größe einer Zelle aufweisen. Diese Beads sind mit Streptavidin überzogen und können entsprechend mit biotinylierten Antikörpern beladen werden. Aus dem verwendeten Kit der Firma Miltenyi stehen die Antikörper CD2, CD3 und CD28 zu Verfügung. Die Antikörper, die zur Aktivierung auf den Beads gekoppelt vorliegen, werden im Folgenden kurz als „Beads-gekoppelte Antikörper“ bezeichnet.

Um den Effekt der Stimulierung von CD2 zu untersuchen, wurden die Beads mit und ohne mAb CD2 beladen. In der Literatur sind nur Beads mit mAb CD3 und CD28 beschrieben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Effekt IL-2 auf die T-Zellen ausübt. Hierzu wurden die IL-2 Konzentrationen variiert.

Tabelle 4.3 Protokolle zur Aktivierung mit Beads-gekoppelten Antikörpern.

Protokoll	Beads 1	Beads 2	Beads 3
Medium	X-Vivo 10	X-Vivo 10	X-Vivo 10
Zusätze	10% HP	10% HP	10% HP
Aktivierung	Beads beladen mit mAb CD2/CD3/CD28 + 20 U/ml IL-2 an Tag 3, 7 und 11	Beads beladen mit mAb CD3/CD28 + 20 U/ml IL-2	Beads beladen mit mAb CD3/CD28 + 100 U/ml IL-2

4.2.4 Die Vitalität und Expansion primärer humaner T-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsprotokollen

Die isolierten T-Zellen wurden über 14 Tage expandiert. Abbildung 4.4 zeigt die Expansion und die Vitalität der aktivierten T-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsprotokollen.

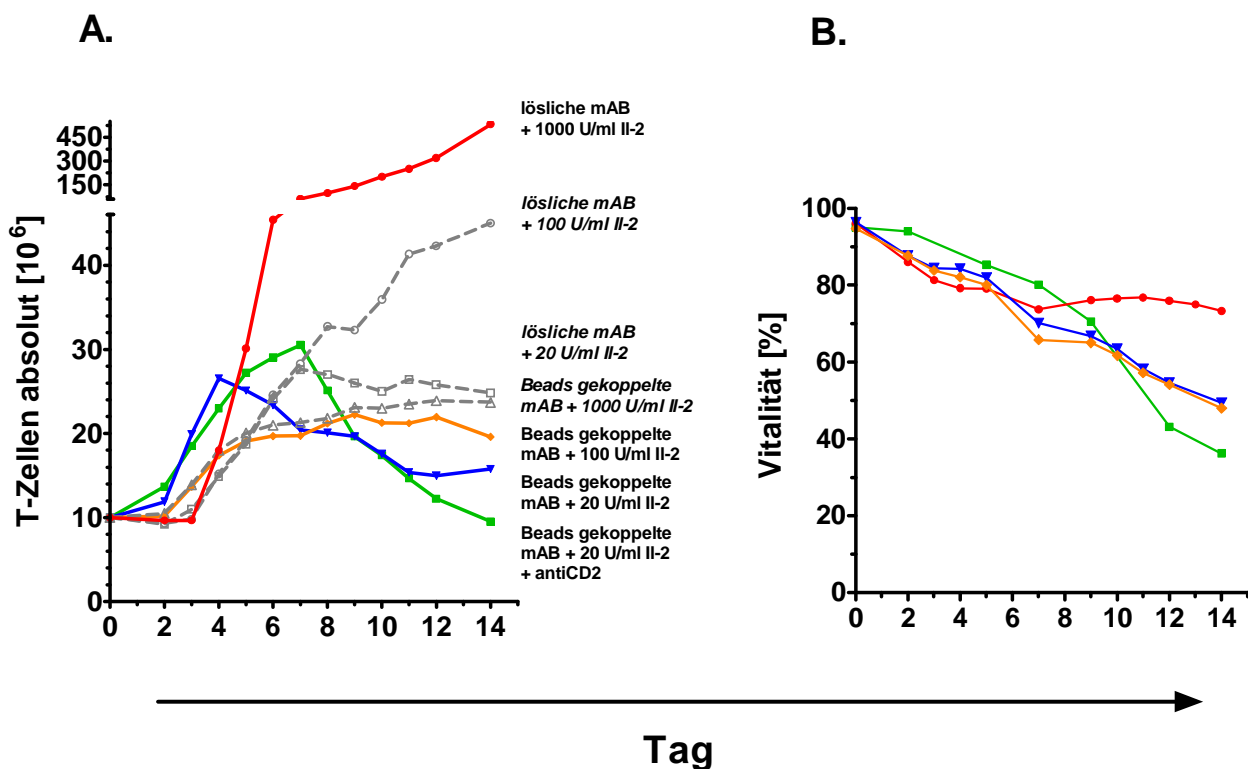


Abbildung 4.4 Expansion und Vitalität kultivierter T-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsprotokollen. Es wurden primäre humane T-Zellen isoliert und zunächst mit den löslichen Antikörpern CD3, CD28 + 1000 U/ml IL-2 sowie mit den Beads-gekoppelten Antikörpern wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben aktiviert ($n = 7-9$). Unter Verwendung dieser Aktivierungsprotokolle zeigte sich bereits ein starker IL-2 Effekt hinsichtlich der Proliferation. Außerdem deutete sich an, dass die löslichen Antikörper selbst einen Proliferationsreiz auf die T-Zellen ausüben könnten. Deswegen wurden zur Untersuchung der Expansion weitere Aktivierungsprotokolle getestet, um die Effekte besser herauszuarbeiten ($n = 3-4$). Es kamen die löslichen Antikörper CD3, CD28 zum Einsatz in Verbindung mit 20 U/ml sowie mit 100 U/ml IL-2. Außerdem wurden die Beads-gekoppelten Antikörper CD3, CD28 in Kombination mit 1000 U/ml IL-2 verwendet. Abbildung **A.** zeigt die Expansionsrate und **B.** die Vitalität der T-Zellen unter den verschiedenen Aktivierungsprotokollen.

Die mit den löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 stimulierten T-Zellen nahmen zunächst über die ersten 3 Tage ab, zeigten schließlich jedoch die stärkste Expansion (im Median 40fach). Die Vitalität fiel nicht unter 73% und unterschied sich damit ab Tag 7 von der Vitalität der Zellen, die mit weniger IL-2 stimuliert wurden.

Die T-Zellen, die mit anti-CD2/CD3/CD28 Beads aktiviert wurden, wuchsen bis Tag 7 gut (2-3fache Expansion im Median). Im Anschluss kam es jedoch zu einer kontinuierlichen Abnahme. Diese Abnahme korrelierte auch mit der sinkenden Vitalität.

Es schien, als übe die erhöhte IL-2 Konzentration einen positiven Effekt auf den Erhalt der Proliferation aus. Deswegen wurden die Versuche mit löslichen Antikörpern + 20 U/ml bzw. + 100 U/ml IL-2 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die T-Zellen tatsächlich IL-2 abhängig wuchsen. Unter Stimulierung mit den löslichen Antikörpern konnte die Expansion durch Erhöhung der IL-2 Konzentration von 20 auf 100 U/ml um den Faktor 1,8 und durch Erhöhung von 100 auf 1000 U/ml um den Faktor 23 gesteigert werden.

Jedoch schienen die löslichen Antikörper auch selbst einen Proliferationsreiz auszuüben, denn die Expansionsraten lagen immer höher im Vergleich zu den T-Zellen, die mit Beads-gekoppelten Antikörpern und der vergleichbaren IL-2 Konzentration aktiviert worden waren. Obwohl bei den Versuchen mit anti-CD3/CD28 Beads + 20 vs. + 100 vs. + 1000 U/ml IL-2 auch IL-2 abhängige Unterschiede gezeigt werden konnten, fielen die Differenzen hinsichtlich der Expansionsraten deutlich kleiner aus.

Hohe IL-2 Konzentrationen sowie die löslichen Antikörper selbst hatten zur Folge, dass die Zellzahl zu Beginn bis Tag 2 oder 3 leicht abnahm. Diese Abnahme könnte auf eine verstärkte Apoptose durch den AICD der Zellen zurückzuführen sein.

Schließlich muss noch festgehalten werden, dass sich die T-Zellen selbst unabhängig vom Aktivierungsprotokoll sehr unterschiedlich verhalten. Es wurden interindividuelle ebenso wie interexperimentelle Unterschiede festgestellt. Die T-Zellen einiger Spender ließen sich fast immer gut expandieren, während andere Spender zur Expansion weniger geeignete T-Zellen besaßen. Gleichzeitig zeigten sich auch Unterschiede zwischen den T-Zellen desselben Spenders, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden. So expandierten die T-Zellen desselben Spenders einmal 10fach und ein anderes Mal 70fach (aktiviert mit den löslichen Antikörpern und 1000 U/ml IL-2). Entsprechend hohe interexperimentelle Schwankungen wurde beobachtet (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Interexperimentelle Schwankungen hinsichtlich des Wachstums und der Vitalität CD3 selektierter T-Zellen in der Zellkultur (n=7-9). Die Tabelle A. stellt die Expansionsraten als Faktor ausgehend von der Zellzahl an Tag 0 dar, wobei jeweils die maximale Expansion, die mit dem jeweiligen Protokoll erzielt wurde, gezeigt ist. Die Tabelle B. zeigt die Vitalität (%) an den Tagen 7 und 14.

A.

Protokoll	Lösliche mAb + 1000 U/ml IL-2	Anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2	Anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2	Anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2
Median	40	3,2	2,2	2,4
Bereich	1,4-122	2,7-3,3	1,1-6,6	1,4-15
Mittelwert	47	3,1	2,6	3,8
SD	45	0,4	1,6	4,6

B. Tag 7/Tag 14

Protokoll	Lösliche mAb + 1000 U/ml IL-2		Anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2		Anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2		Anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2	
Median	75	70	80	33	71	41	60	54
Bereich	56-89	57-88	76-84	31-44	44-97	22-93	44-84	20-81
Mittelwert	74	73	80	36	70	18	66	17
SD	12	11	4	7	49	26	48	24

4.2.5 Expansion und Vitalität selektierter CD3⁺ T-Zellen im Vergleich zu mononukleären Zellen unter Aktivierung

Um zu überprüfen, ob die Isolierung der T-Zellen einen Effekt auf die Vitalität und Expansionskapazität hat, wurden auch mononukleäre Zellen (MNZ) kultiviert. Eine gemischte Zellkultur könnte einen positiven Effekt auf das Wachstum der T-Zellen haben, weil von anderen Zellen ausgeschüttete Zytokine und Wachstumsfaktoren T-Zellen zur Proliferation anregen können. In Abbildung 4.5 sind Vitalität und Zellzahl über 14 Tage dargestellt. Hier fand sich kein Unterschied zwischen mittels RosetteSep isolierten T-Zellen und T-Zellen in der Umgebung anderer mononukleärer Zellen.

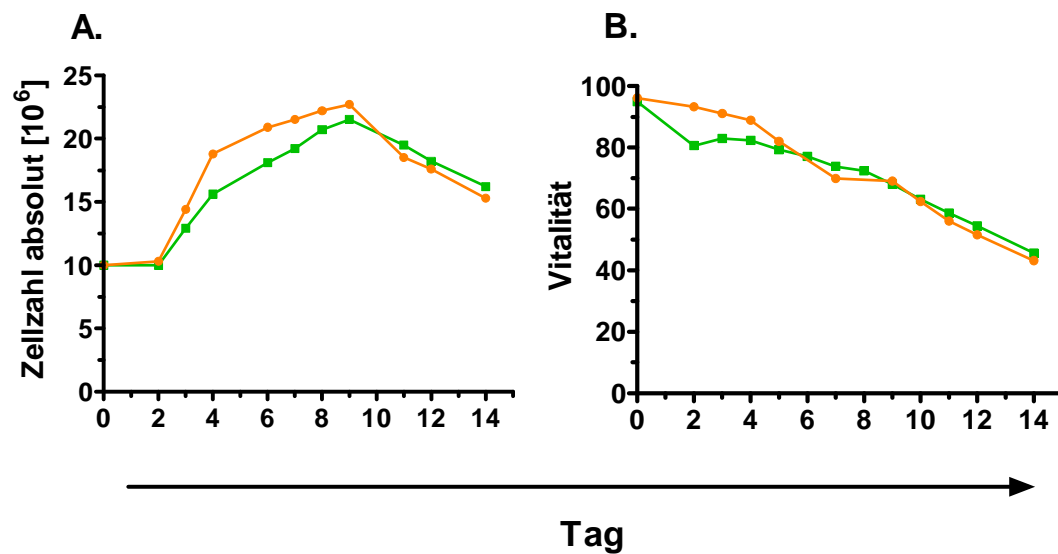


Abbildung 4.5 Wachstum CD3⁺ selektierter T-Zellen und mononukleärer Zellen (n=4). In Abbildung A. ist die Expansion und B. die Vitalität von RosetteSep isolierten T-Zellen (—) und CD3⁺ T-Zellen in Umgebung anderer mononukleärer Zellen (—) unter Stimulierung mit anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 dargestellt. Die Kurven resultieren aus den gemittelten Daten von 4 unabhängigen Experimenten mit Zellen des jeweils selben Spenders.

In dieser Versuchsreihe waren die interexperimentellen Schwankungen nicht sehr ausgeprägt. Die T-Zellen der verschiedenen Spender - teilweise auch zu unterschiedlich Zeitpunkten isoliert - ließen sich in einem ähnlichen Ausmaß expandieren, so dass die Standardabweichung auffallend klein ausfiel (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5 Interexperimentelle Schwankungen in der Versuchsreihe zum Vergleich des Wachstums zwischen selektierten T-Zellen und CD3⁺ Zellen in Umgebung von MNZ (n=4). Tabelle A. zeigt die Schwankungen in der jeweils maximalen Expansionsrate und B. der Vitalität (%) an Tag 7 und 14.

A.

Protokoll	RosetteSep isolierte T-Zellen	CD3 ⁺ Zellen in Umgebung von MNZ
Median	2,3	2,3
Bereich	1,5-3	1,5-2,6
Mittelwert	2,3	2,1
SD	0,6	0,4

B. Tag 7/Tag 14

Protokoll	RosetteSep isolierte T-Zellen		CD3⁺ Zellen in Umgebung von MNZ	
Median	68	48	74	47
Bereich	59-84	20-56	71-78	40-50
Mittelwert	70	43	74	46
SD	12	17	2,8	4,7

4.2.6 Expansionsrate und Vitalität von frisch aufgetauten T-Zellen

Da Spende, Aufreinigung und Gabe der Zellen nicht immer aufeinander abgestimmt werden können, werden die Zellen nach der Selektion kontrolliert eingefroren. Bei Bedarf werden die Zellen dann wieder aufgetaut und dem Patienten verabreicht. Dieses Verfahren findet sowohl bei der SZT als auch der Gabe einer unmanipulierten DLI Anwendung.

Es stellt sich nun die Frage, ob dieses Verfahren auch sinnvoll angewendet werden kann, wenn die Zellen direkt nach dem Auftauen transduziert werden sollen. Zur Untersuchung dieser Frage wurden T-Zellen kontrolliert eingefroren und entsprechend der Anweisung aus der Klinik (SOP; Methodenteil 3.2.4) aufgetaut. Die aufgetauten T-Zellen wurden in Kultur genommen und über 14 Tage expandiert.

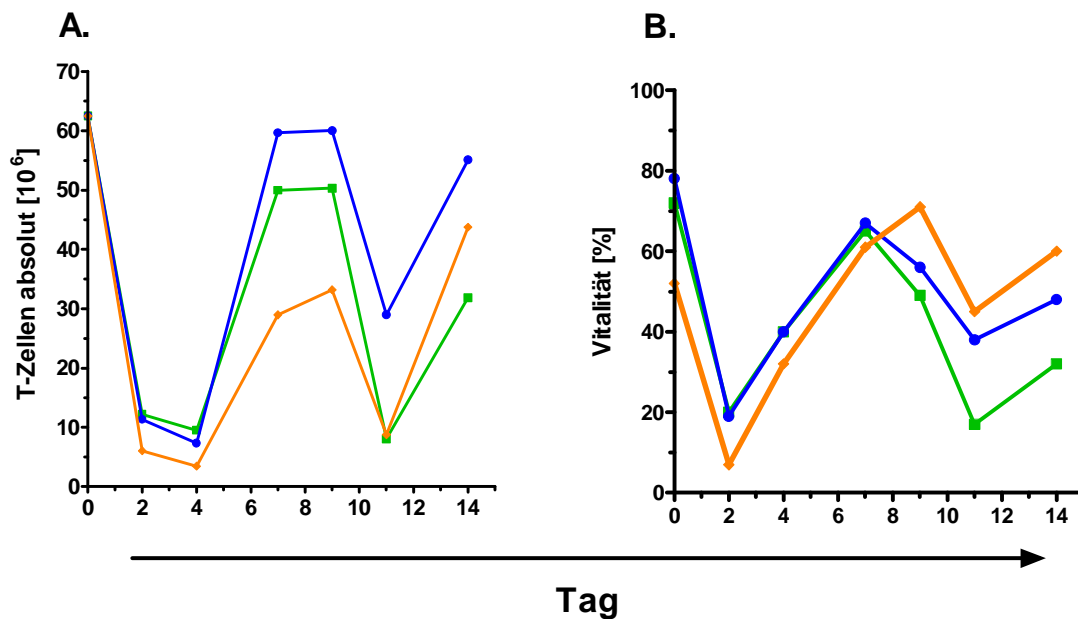


Abbildung 4.6 Expansionrate und Vitalität von frisch aufgetauten Zellen. Es wurden kontrolliert eingefrorene T-Zellen von 3 Spendern aufgetaut, in Kultur genommen und mit anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 stimuliert. Abbildung **A.** zeigt die Expansionsrate und **B.** die Vitalität (%) der aufgetauten Zellen.

Direkt nach dem Auftauen lag die Vitalität im Mittel nur bei 67% und sank in den folgenden 4 Tagen sogar auf 37%. Die Zellen erholten sich langsam wieder bis Tag 7 und erreichten eine Vitalität von 64%. Danach zeigte sich wieder ein Einbruch mit anschließend leichter Erholung.

Da die T-Zellen für eine Suizidgenstrategie an den Tagen 3 und 4 transduziert werden sollen, ist die Verwendung von aufgetauten Zellen nicht geeignet. Wenn nur tiefgefrorene Zellen zur Verfügung stehen, müsste die Transduktion zeitlich nach hinten verschoben werden. Dadurch würde die ex vivo Kulturperiode stark verlängert werden.

4.2.7 Expansion und Vitalität in der Zellkulturflasche und im Beutel

Für die klinische Anwendung ist es erstrebenswert, die ex vivo Kultur in einem Beutelsystem durchzuführen, um die Kontaminationsgefahr gering zu halten. Deswegen sollte untersucht werden, ob das Wachstum der T-Zellen im Beutel mit dem in der Zellkulturflasche vergleichbar ist.

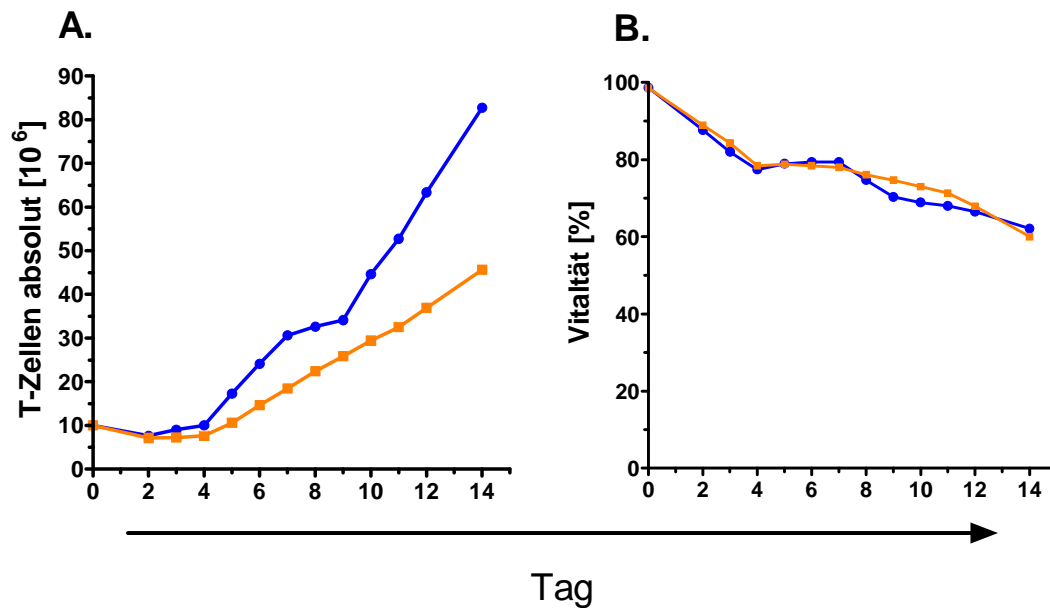


Abbildung 4.7 Expansion und Vitalität von T-Zellen in der Zellkulturflasche im Vergleich zur Kultivierung in Beuteln. Die primären humanen T-Zellen wurden mittels der RosetteSep-Prozedur isoliert und mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 aktiviert ($n=4$). Abbildung **A.** zeigt die Expansion und **B.** die Vitalität der T-Zellen in der Zellkulturflasche (—) und der T-Zellen im Beutel (—).

Obwohl sich die Vitalität der Zellen kaum unterschied, war das Wachstum im Beutel immer schwächer als in einer Zellkulturflasche (mittlere Expansionsrate 4,5- vs. 8,2fach). Das Wachstum der T-Zellen entsprach ansonsten den übrigen Experimenten mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 (Abbildung 4.4), d.h. die Zellzahl fiel zunächst leicht ab, stieg dann aber kontinuierlich über 14 Tage an. Jedoch war die Expansionsrate im Median deutlich geringer (6- vs. 40fach).

Es ist also möglich, für die klinische Anwendung auf ein Beutelsystem umzusteigen, ohne dass die Vitalität der Zellen leidet. Jedoch muss mit einem geringeren Wachstum gerechnet und die Zellzahl entsprechend adjustiert werden. Für die folgenden Experimente wurde immer in der Flasche kultiviert, um eine einfache Probenentnahme zu ermöglichen.

Bei dieser Versuchsreihe zeigten sich sehr starke interexperimentelle Schwankungen (Tabelle 4.6). Hierdurch wird noch einmal deutlich, wie unterschiedlich die T-Zellen in Abhängigkeit vom Spender sowie wahrscheinlich auch von dessen aktueller gesundheitlicher Konstitution wachsen können.

Tabelle 4.6 Interexperimentelle Schwankungen bei Wachstum und Vitalität CD3 selektierter T-Zellen kultiviert in Zellkulturflaschen und in Beuteln (n=4). Die Tabelle **A.** zeigt die Abweichungen in der maximalen Expansionsrate und **B.** in der Vitalität (%) an Tag 7 und 14.

A.

Protokoll	T-Zellen in Zellkulturflaschen	T-Zellen in Beuteln
Median	6	2,6
Bereich	1,5-20	0,9-12
Mittelwert	8,3	4,6
SD	8,7	5

B.

Protokoll	T-Zellen in Zellkulturflaschen		T-Zellen in Beuteln	
Median	78	62	79	56
Bereich	74-87	40-84	69-86	40-88
Mittelwert	79	62	78	60
SD	6	19	7,3	20

4.3 Das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen unter Stimulierung

Physiologisch liegt das Verhältnis von $CD4/CD8$ im peripheren Blut eines Erwachsenen bei 1,7 (Bereich 0,9-4,5) (Fahey 1992); in der vorliegenden Arbeit lag nach der T-Zellselektion im Mittel ein Verhältnis von 3,3 vor (Median 2,8; Bereich 2,1-5,4).

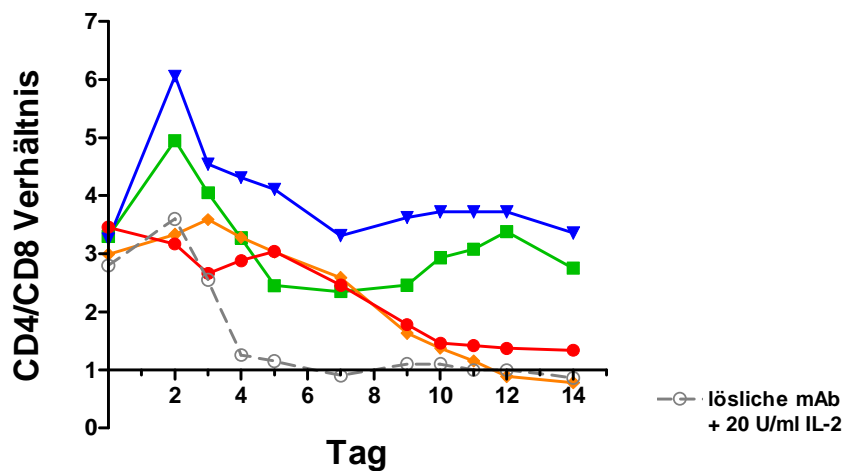


Abbildung 4.8 Das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen unter Stimulierung mit verschiedenen Aktivierungsprotokollen. Die T-Zellen wurden isoliert und mit löslichen Antikörper + 1000 U/ml IL-2 (—), anti- $CD2/CD3/CD28$ Beads + 20 U/ml IL-2 (—), anti- $CD3/CD28$ Beads + 20 U/ml IL-2 (—) oder mit anti- $CD3/CD28$ Beads + 100 U/ml IL-2 (—) aktiviert. Um einen IL-2 Effekt besser darstellen zu können, wurden außerdem noch selektierte $CD3^+$ T-Zellen mit löslichen Antikörpern + 20 U/ml IL-2 expandiert (—). Die einzelnen Werte ergeben sich als Mittelwert aus 3-5 unabhängigen Experimenten.

Es fällt auf, dass die T-Zellen, die mit anti- $CD3/CD28$ Beads + 100 U/ml und mit den löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 aktiviert worden sind, eine stärkere Tendenz zur Inversion des physiologischen $CD4/CD8$ Verhältnisses zeigten als die T-Zellen, die nur 20 U/ml IL-2 erhielten. Bei den Protokollen mit Beads-gekoppelten Antikörpern + 20 U/ml IL-2 stieg der Quotient sogar zunächst stark an, d.h. die $CD4^+$ T-Zellen wuchsen besonders stark. Über den Zeitraum von 14 Tagen betrachtet blieb das Verhältnis nahezu unverändert. Dem gegenüber scheint es, als würde eine höhere IL-2 Konzentration die $CD8^+$ T-Zellen bevorzugt stimulieren, so dass der Quotient über 14 Tage betrachtet abnimmt. Um diesen IL-2 Effekt zu überprüfen, wurden nachträglich Versuche mit löslichen Antikörpern $CD3$, $CD28$ + 20 U/ml IL-2 (grau eingezeichnete Kurve) durchgeführt. Wie in der Abbildung zu erkennen fiel der

Quotient trotz der geringen IL-2 Konzentration stark ab. Ab Tag 6 blieb das Verhältnis von 1:1 schließlich konstant bis Tag 14. Damit konnte gezeigt werden, dass die löslichen Antikörper per se zumindest zu Beginn bevorzugt die CD8⁺ T-Zellen stimulieren.

Im Vergleich lösliche Antikörper + 20 U/ml vs. + 100 U/ml IL-2 mit Zellen desselben Spenders sank der Quotient mit der höheren IL-2 Konzentration stärker (Daten grafisch nicht dargestellt). Daraus folgt, dass neben den löslichen Antikörpern wahrscheinlich auch die IL-2 Konzentration eine Rolle spielt hinsichtlich der Veränderung des CD4/CD8 Quotienten.

4.4 Einfluss der Aktivierung auf den Immunstatus primärer humaner T-Zellen

Der Immunstatus wurde auf zwei verschiedene Arten ausgewertet: Zum einen wurde der prozentuale Anteil der Subpopulation an den Gesamtlymphozyten ausgewertet. Andererseits wurden die Absolutwerte in Zellen/μl über die gemessene Absolutzahl an Leukozyten errechnet. Damit konnte eine absolute Zu- oder Abnahme der Subpopulationen dargestellt werden, auch wenn ihr prozentualer Anteil nur gering war.

Tabelle 4.7 T-Zellsubpopulationen in Kultur nach Isolierung. Die CD3⁺ T-Zellen wurden mittels der RosetteSep-Prozedur oder unter Verwendung von CD3 Microbeads in Verbindung mit einer Säule isoliert. Die Messung eines großen Immunstatus erfolgte direkt nach Inkulturnahme an Tag 0 (n=11).

Phenotype	Funktion	Median [Zellen/μl]	Bereich [Zellen/μl]
CD3 ⁺	T-Zelle	1676	709-7074
CD4 ⁺	T-Helferzelle (T _h)	1327	535-4915
CD8 ⁺	Zytotoxische T-Zelle (T _c)	437	183-2040
CD56 ⁺	NK-Zelle	0	0-68
CD19 ⁺	B-Zelle	0	0-51
CD3 ⁺ CD56 ⁺	NKT-Zelle	8	1-65
CD8 ⁺ CD69 ⁺	Frühe Aktivierung	11	2-223
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Späte Aktivierung	50	19-194
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁺	naive T _c	118	0-603
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁻	Effektor T _c	246	61-1065
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	CD8 Gedächtniszelle	85	31-605
CD4 ⁺ CD69 ⁺	Frühe Aktivierung	7	2-320
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	Späte Aktivierung	43	14-462
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	naive T _h	395	137-3202
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	Gedächtnis T _h	404	189-2820
CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 Regulatorische T-Zelle	107	10-238

In Abbildung 4.9 sind die Veränderungen der Zellzahl als Faktor dargestellt. Das heißt, es wurde ausgehend von den Absolutwerten (Zellen/ μ l) an Tag 0 für jede Subpopulation die x-fache Expansion an den Tagen 3, 5, 7, 9, 12 und 14 berechnet, die bei Zunahme > 1 und bei Abnahme < 1 ist.

Es ist zu erkennen, dass insbesondere die aktivierten T-Zellen (hellblau und lila) und die Gedächtniszellen (rot) zunahmen unabhängig davon wie aktiviert wurde. Die naiven Subtypen (grün) expandierten kaum oder nahmen sogar schon ab Tag 3 ab. In der Folge invertierte das Verhältnis von naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen. Eine Ausnahme bildeten die naiven CD8 T-Zellen ($CD8^+CD45RA^+CD28^+$), die unter Stimulierung mit anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 zunahmen. Diese Expansion war zu Beginn stark und ebte dann ab. Die Abnahme korrelierte mit der Abnahme der $CD3^+$ Zellen insgesamt (Abbildung 4.4).

Bei der Aktivierung mit den löslichen Antikörpern fällt auf, dass die zytotoxischen Effektorzellen ($CD8^+CD45RA^+CD28^-$; orange) zunahmen, obwohl sie unter Stimulierung mit allen anderen Protokollen abnahmen.

Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen; $CD3^+CD56^-$) – in gelb dargestellt – zeigten eine besonders starke Expansion unter Aktivierung mit löslichen Antikörpern. An Tag 9 fand bereits eine 117fache und an Tag 14 sogar eine 2969fache Expansion im Median statt. Die Expansion schien IL-2 abhängig zu sein, denn von 20 über 100 bis zu 1000 U/ml IL-2 erhöhte sich die Expansionsrate jeweils um eine Zehnerpotenz.

Ebenso wie die NKT-Zellen schienen auch die regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen IL-2 abhängig zu wachsen. Um diese Abhängigkeit der beiden Subpopulationen zu überprüfen, wurden T-Zellen desselben Spenders mit anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml vs. + 1000 U/ml IL-2 expandiert. Zwar wuchsen die $CD4^+CD25^+$ Zellen mit den 1000 U/ml besser als mit 20 U/ml IL-2, aber der Unterschied war gering (Faktor 1,5-2). Im Gegensatz dazu bestätigte sich, dass die NKT-Zellen IL-2 abhängig wachsen. Das Wachstum war mit 1000 U/ml um den Faktor 8 höher als mit 20 U/ml (grafisch nicht dargestellt).

Auffällig war, dass an Tag 3 mit den löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 sowie mit anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 kaum Veränderungen zu sehen waren, während unter Stimulierung mit der geringen IL-2 Konzentration von 20 U/ml die aktivierten T-Zellen schon stark zugenommen hatten. Diese Beobachtung entsprach auch den Expansionskurven der $CD3^+$ T-Zellen insgesamt (Abbildung 4.4). Dabei ist zu erkennen, dass die Zellzahl mit

höheren IL-2 Konzentrationen zunächst leicht abfiel. Dahingegen stieg die Zellzahl bei Aktivierung mit 20 U/ml IL-2 sofort an.

Abbildung 4.9 A.

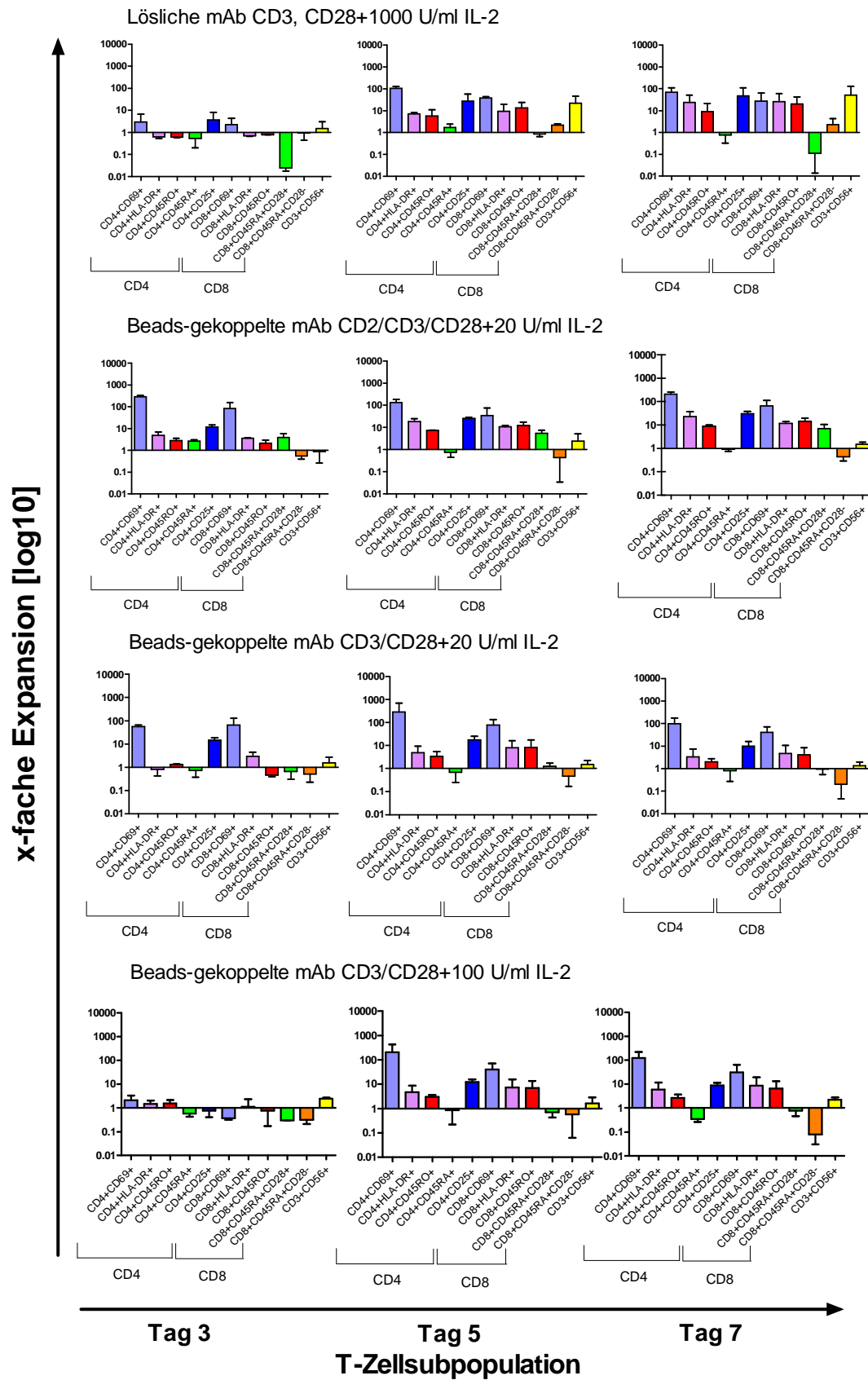
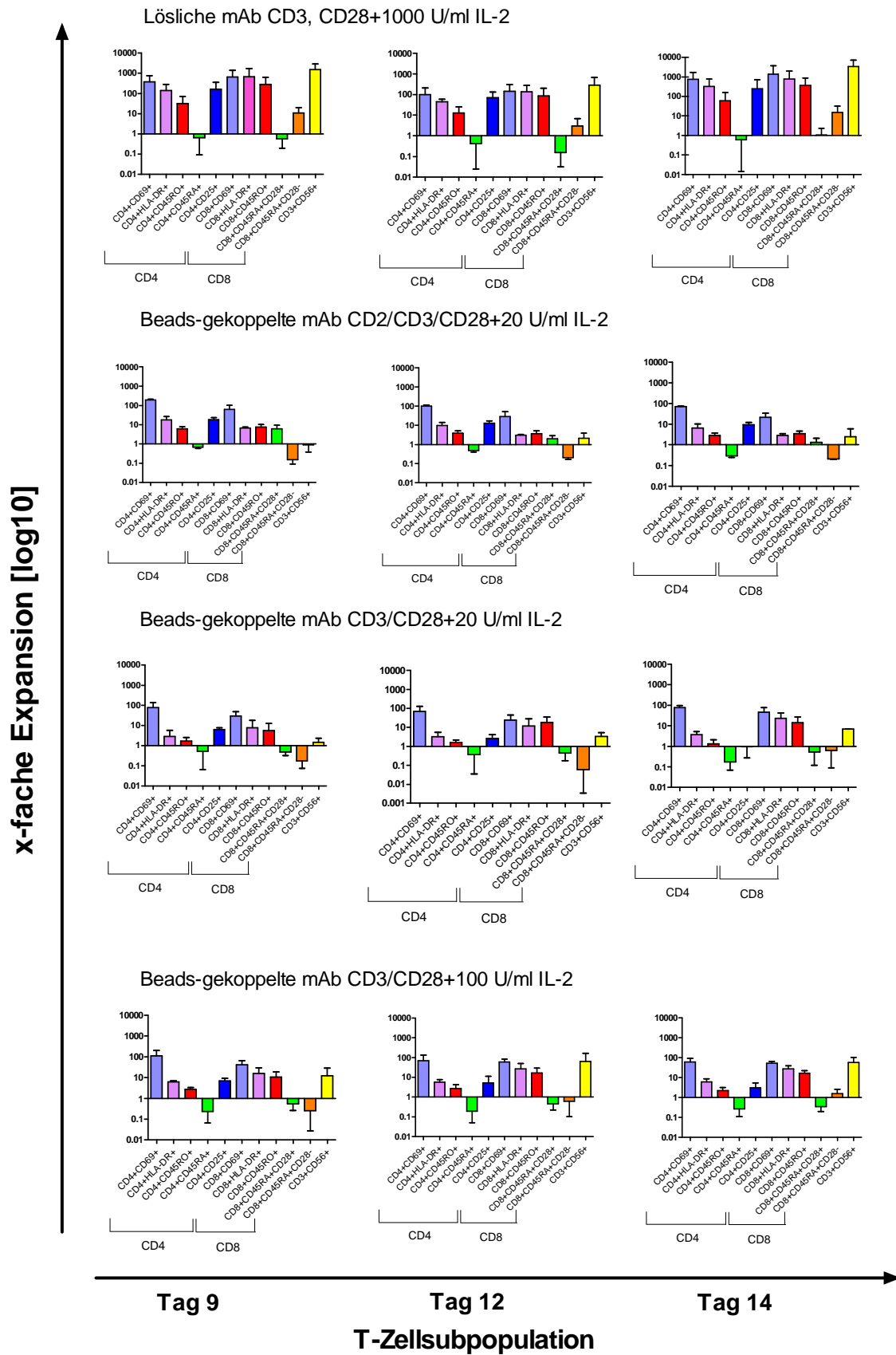


Abbildung 4.9 B.



Prozentual betrachtet dominierten die Gedächtniszellen und die T-Zellen mit frühen und späten Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche. Während diese Subpopulationen direkt nach Selektion nur gering vertreten waren ($< 5\%$), stieg ihr Anteil unter Expansion auf $> 50\%$ an. In Tabelle 4.3 ist die prozentuale Verteilung der Subpopulationen direkt nach Selektion angegeben. Abbildung 4.10 zeigt für jedes Aktivierungsprotokoll den Anteil der zwei größten Populationen an Tag 7 und 14.

Tabelle 4.8 Prozentualer Anteil der Subpopulationen direkt nach T-Zellisolierung. Die CD3⁺ T-Zellen wurden mittels der RosetteSep-Prozedur oder unter Verwendung von CD3 Microbeads in Verbindung mit einer Säule isoliert. Die Messung eines großen Immunstatus erfolgte direkt nach Inkulturnahme an Tag 0 (n=11).

Phenotype	Funktion	Median [%]	Bereich [%]
CD3 ⁺	T-Zelle	95.9	88.8-99.7
CD4 ⁺	T-Helferzelle (T _h)	72.1	65.4-81.9
CD8 ⁺	Zytotoxische T-Zelle (T _c)	24.1	14.3-31.5
CD56 ⁺	NK-Zelle	0.4	0-3.5
CD19 ⁺	B-Zelle	0.3	0-2.6
CD3 ⁺ CD56 ⁺	NKT-Zelle	0.9	0-2.8
CD8 ⁺ CD69 ⁺	Frühe Aktivierung	1.2	0-4.8
CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Späte Aktivierung	2.8	0.8-6.4
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁺	naive T _c	8.9	0-22.7
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁻	Effektor T _c	10.2	2- 25
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	CD8 Gedächtniszelle	5.4	2.8-11
CD4 ⁺ CD69 ⁺	Frühe Aktivierung	2.2	0.2-15
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	Späte Aktivierung	3.7	1.4-7
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	naive T _h	35.3	21-47
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	Gedächtnis T _h	42.4	26-52
CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 Regulatorische T-Zelle	4.2	0.9-7

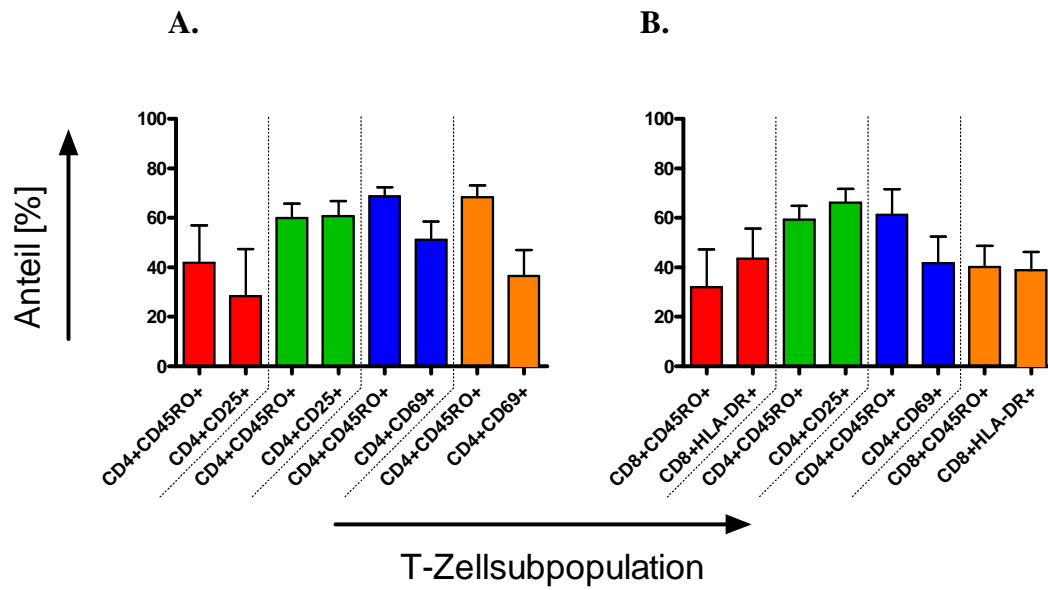


Abbildung 4.10 Veränderung des prozentualen Anteils im T-Helfer und T-Suppressor Kompartiment unter 7-tägiger Stimulierung. Die Zusammensetzung der beiden größten T-Zellsubpopulationen in der Kultur **A.** an Tag 7 und **B.** an Tag 14 nach Aktivierung mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 (rot), anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 (grün), anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 (blau) und mit anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 (orange); n=3-5.

4.5 Verteilung der T-Zellsubpopulationen vor und nach Transduktion mit dem retroviralen HSV-TK/CD34 Vektor

Für die immunologische Wirksamkeit ist die Entwicklung der T-Zellsubpopulationen unter Stimulierung von Bedeutung. Es stellte sich nun jedoch auch die Frage, welche Subpopulationen schließlich transduziert werden und damit die eigentlich manipulierte DLI darstellen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden T-Zellen zum einen mit löslichen und zum anderen mit Beads-gekoppelten Antikörpern aktiviert und mit dem retroviralen Vektor HSV-TK/CD34 transduziert. Die Transduktionseffizienz lag bei 10-20%. Durch die Expression des CD34 Antigens auf der Zelloberfläche konnten die transduzierten ($CD3^+CD34^+$) von den nicht transduzierten ($CD3^+CD34^-$) T-Zellen unterschieden werden. Parallel wurden Zellen desselben Spenders aktiviert und kultiviert, aber nicht transduziert. So konnten die Veränderungen bezüglich der immunologischen Subtypen zwischen nur kultivierten und transduzierten T-Zellen untersucht werden. Damit ließ sich der Einfluss des Transduktionsprozesses per se bestimmen.

Die Aktivierung mit löslichen Antikörpern hatte zur Folge, dass hauptsächlich $CD8^+$ T-Zellen transduziert wurden, während $CD4^+$ T-Zellen nahezu resistent erschienen: Die mittlere Transduktionseffizienz bezogen auf die $CD8^+$ Zellen lag bei 92%. Jedoch konnten nur 5% $CD4^+$ Zellen transduziert werden.

Entsprechend weniger wurden auch $CD4^+$ gegenüber $CD8^+$ Gedächtniszellen transduziert, wobei Gedächtniszellen noch besser transduzierbar waren als naive T-Zellen. Insbesondere die naiven $CD4^+$ konnten kaum transduziert werden, während sich in der untransduzierten $CD34^-$ Fraktion 38% $CD4^+CD45RA^+$ Zellen befanden. Naive $CD8^+CD45RA^+CD28^+$ Zellen waren gut transduzierbar. Die zytotoxischen Effektorzellen ($CD8^+CD45RA^+CD28^-$) waren nach der Transduktion verschwunden.

Regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^+$) und NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+$) ließen sich zwar transduzieren, stellten aber bezogen auf die gesamte $CD34^+$ Population keinen großen Anteil dar. Im Gegensatz dazu waren die aktivierten $CD8^+$ T-Zellen ($CD8^+CD69^+$ und $CD8^+HLA-DR^+$) in der $CD34^+$ Population besonders stark vertreten. Da ihr Anteil so hoch lag, dass insgesamt 100% überschritten wurden, ist anzunehmen, dass andere Subtypen zusätzlich Aktivierungsmarker exprimierten (doppeltpositive Zellen). Der frühe Aktivierungsmarker CD69 wurde häufiger exprimiert als der späte Marker HLA-DR. Dieses Phänomen korrelierte auch mit den Expansionsdaten der Subpopulationen (Abbildung 4.9).

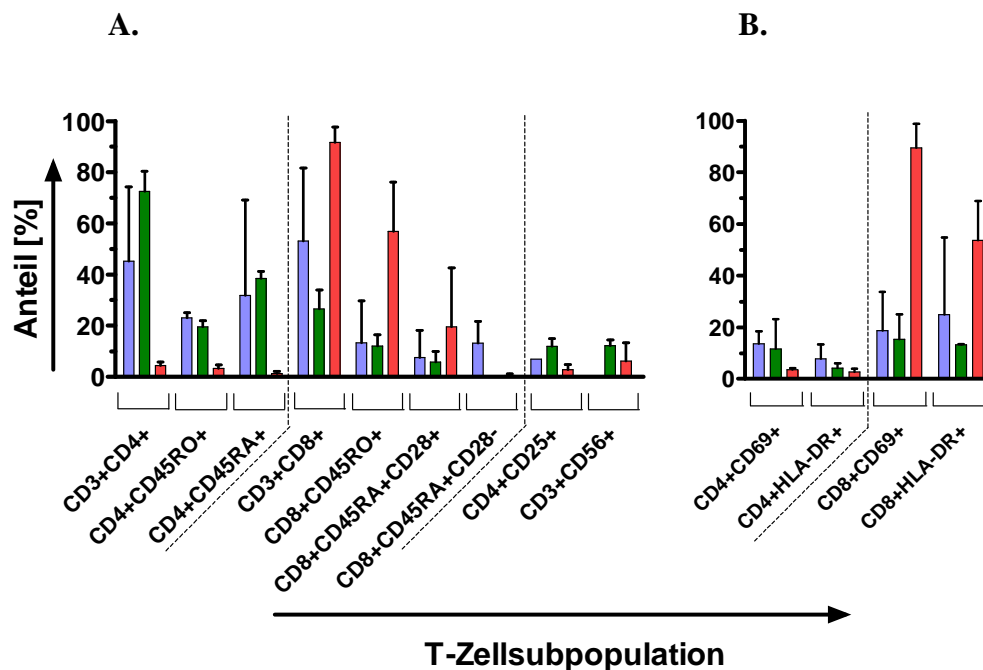


Abbildung 4.11 Verteilung der T-Zellsubpopulationen vor und nach Transduktion unter Aktivierung mit löslichen Antikörpern. Die $CD3^+$ T-Zellen wurden isoliert und mit den löslichen Antikörpern CD3, CD28 + 1000 U/ml IL-2 aktiviert. Die Transduktion mit dem Vektor HSV-TK/CD34 fand an den Tagen 3 und 4 statt ($n=3$). Die Messungen der Lymphozytensubpopulationen erfolgten an Tag 7. Die transduzierten Zellen wurden über das neu exprimierte Oberflächenantigen CD34 bestimmt ($CD34^+$ Population = rot), während die nicht transduzierten T-Zellen immunphänotypisch $CD3^+CD34^-$ blieben (grün). Parallel wurden T-Zellen kultiviert, die nicht zur Transduktion verwendet wurden (blau). Diese T-Zellen dienen zum immunphänotypischen Vergleich mit den transduzierten T-Zellen.

Im Unterschied zu den löslichen Antikörpern konnte mit den Beads-gekoppelten Antikörpern zur Aktivierung der T-Zellen erreicht werden, dass die Subpopulationen nahezu homogen transduziert wurden. Die Transduktionseffizienz bezogen auf die $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen lag bei 51 bzw. 46%.

In der $CD34^+$ Fraktion befanden sich lediglich 5% naive $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen. Jedoch lag ihr Anteil in der $CD34^-$ Population (10%) sowie in der mitgeführten, aber nicht der Transduktion unterzogenen Kultur (13%) auch nicht sehr viel höher. Ebenso wie bei der Transduktion unter Aktivierung mit den löslichen Antikörpern war der Anteil der $CD8^+CD45RA^+CD28^+$ Zellen in der $CD34^+$ größer als in der $CD34^-$ Population und der mitgeführten Kultur, jedoch mit einem marginalen Unterschied. Die zytotoxischen Effektorzellen ($CD8^+CD45RA^+CD28^-$) verschwanden.

Die regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen waren in allen Gruppen stark vertreten, während sich die NKT-Zellen lediglich in der $CD34^+$ Population wiederfinden ließen. Die aktivierten T-Zellen waren in allen Gruppen ähnlich stark vertreten mit Ausnahme der $CD8^+HLA-DR^+$ Zellen, die von der mitgeführten, aber nicht der Transduktion unterzogenen Kultur über die $CD34^-$ Population bis zur $CD34^+$ Population zunahmen.

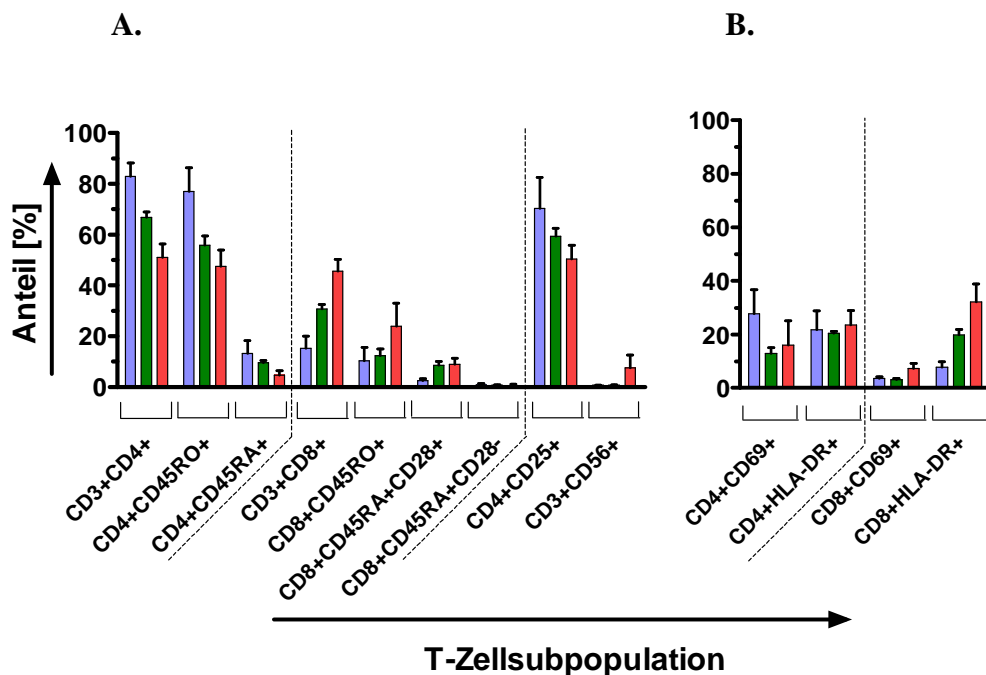


Abbildung 4.12 Verteilung der T-Zellsubpopulationen vor und nach Transduktion unter Aktivierung mit Beads-gekoppelten Antikörpern. Die $CD3^+$ T-Zellen wurden isoliert und mit den Beads-gekoppelten Antikörpern CD2, CD3 und CD28 + 20 U/ml IL-2 aktiviert. Die Transduktion mit dem Vektor HSV-TK/CD34 fand an den Tagen 3 und 4 statt (n=3). Die Messungen der Lymphozytensubpopulationen erfolgten an Tag 7. Die transduzierten Zellen wurden über das neu exprimierte Oberflächenantigen CD34 bestimmt ($CD34^+$ Population = rot), während die nicht transduzierten T-Zellen immunphänotypisch $CD3^+CD34^-$ blieben (grün). Parallel wurden T-Zellen kultiviert, die nicht zur Transduktion verwendet wurden (blau). Diese T-Zellen dienen zum immunphänotypischen Vergleich mit den transduzierten T-Zellen.

4.6 Expansion CMV-spezifischer T-Zellen nach Aktivierung und nach Transduktion

In Abbildung 4.13 sind die gemittelten Expansionskurven der $CD3^+CD8^+$ CMV-spezifischen T-Zellen dargestellt. Unabhängig von der Art der Aktivierung nahmen die CMV-spezifischen T-Zellen in der ersten Woche zunächst ab, erholten sich dann aber wieder. Die stärkste Expansion konnte schließlich mit den löslichen Antikörpern erzielt werden. Nach 12 Tagen hatten sich die Zellen im Median um das 57fache vermehrt. Diese Beobachtung korreliert auch mit der Expansion der $CD3^+$ Zellen insgesamt (Abbildung 4.4) sowie mit der Tendenz, dass die löslichen Antikörper verstärkt $CD8^+$ T-Zellen zur Proliferation anregen (Abbildung 4.8).

Während die Aktivierung mit anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml und + 100 U/ml IL-2 eine 2-3fache Expansion bewirkte, blieb die Zahl CMV-spezifischer T-Zellen nach Aktivierung mit anti-CD2/CD3/CD28 + 20 U/ml IL-2 bezogen auf 12 Tage konstant. Die Expansion mit Beads-gekoppelten Antikörpern und 100 U/ml IL-2 war gegenüber 20 U/ml stärker. Ergo ließ sich auch bei den CMV-spezifischen $CD3^+CD8^+$ T-Zellen ein IL-2 Effekt auf die Proliferation zeigen.

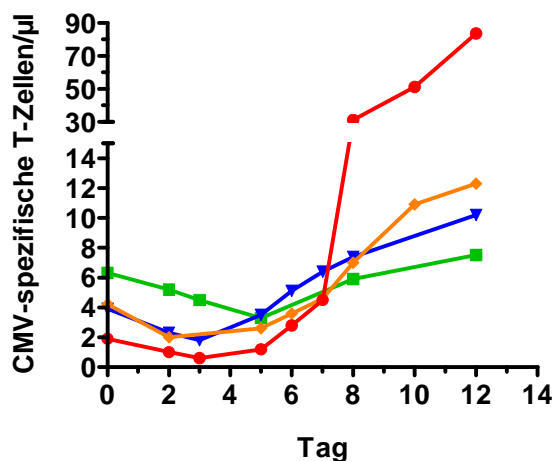


Abbildung 4.14 Expansion CMV-spezifischer T-Zellen nach Aktivierung mit unterschiedlichen Protokollen. Die Expansion CMV-spezifischer T-Zellen wurde über 14 Tage unter Aktivierung mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 (—), anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 (—), anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 (—) und anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 (—) bestimmt. Die Kurven stellen die gemittelten Werte aus 3-4 unabhängigen Versuchen dar.

Die besonders starke Expansion mit den löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 lässt sich jedoch wahrscheinlich primär auf die löslichen Antikörper selbst zurückführen. Denn in einem einzelnen Experiment mit Beads-gekoppelten Antikörpern + 20 vs. + 1000 U/ml IL-2 konnte nur ein mäßiger IL-2 Effekt demonstriert werden.

Wie schon bei der Expansion der CD3⁺ T-Zellen dargestellt, zeigten sich auch bei der Expansion CMV-spezifischer CD3⁺CD8⁺ T-Zellen sehr starke Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9 Interexperimentelle Schwankungen in der Expansion CMV-spezifischer T-Zellen nach Aktivierung mit verschiedenen Protokollen (n=3-4). Die Tabelle stellt die Expansionsraten als Faktor ausgehend von der Zellzahl an Tag 0 bis Tag 12 dar. Der Faktor Tag 12/Tag 0 entspricht der maximalen Expansion.

Protokoll	Lösliche mAb + 1000 U/ml I-2	Anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2	Anti-CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2	Anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2
Median	69	1,3	2,5	3,6
Bereich	12-70	1-1,4	0,5-3,9	2-4,8
Mittelwert	44	1,2	2,7	2,9
SD	29	0,2	1,7	1,2

Analog zu der allgemein erzielten Transduktionseffizienz (10-20%), konnten 13% der in der Kultur vorhandenen CMV-spezifischen T-Zellen unabhängig vom angewandten Aktivierungsprotokoll transduziert werden.

4.7 Zytokinausschüttung unter Stimulierung

Es wurden Th₁- und Th₂-Zytokine gemessen. Nach Aktivierung schütteten T-Zellen die Zytokine des Th₁- und des Th₂-Zweiges aus. Findet eine Verschiebung in die eine oder andere Richtung statt, deutet sich ein Funktionalitätsverlust an. Insgesamt ist die Zytokinausschüttung ein Parameter zur Messung der Funktionalität immunkompetenter Zellen. Als Th₁- Zytokine wurden IL-4, -6, und -10 und als Th₂-Zytokine IL-2, TNF- α und IFN- γ bestimmt. Die Interpretation der gemessenen Werte für IL-2 wurde nicht vorgenommen, da IL-2 selbst schon Bestandteil der Aktivierung war. Die Zytokinausschüttung wurde über 7 Tage beobachtet. Vor und nach der T-Zellselektion lag die Zytokinkonzentration unter der Nachweisgrenze.

Die stärkste Ausschüttung während der T-Zellaktivierung erfolgte innerhalb der ersten 96 h. IFN- γ wurde besonders heftig ausgeschüttet, nach 48 h lag die Konzentration sogar teilweise außerhalb des maximalen Messbereichs. Insgesamt war die Zytokinausschüttung nach Stimulierung mit Beads-gekoppelten Antikörpern höher als mit löslichen Antikörpern. Innerhalb der ersten 48 h zeigten die T-Zellen, die mit anti-CD2/CD3/CD28 Beads + 20 U/ml IL-2 aktiviert worden waren, die stärkste Ausschüttung. Nach 72 h sanken die Spiegel in der Zellkultur jedoch wieder. Nach 96-168 h zeigten sich in der Zytokinausschüttung keine Unterschiede mehr zwischen den Aktivierungsprotokollen mit den löslichen Antikörpern und mit Beads-gekoppelten Antikörpern. Die Abnahme der Zytokinspiegel nach 168 h bei den T-Zellen, die über Beads aktiviert wurden, korrelierte mit der fallenden Zellzahl dieser T-Zellen insgesamt (Abbildung 4.4). Im Unterschied dazu stieg die Zellzahl bei den T-Zellen, die mit den löslichen Antikörpern aktiviert worden waren, während die Zytokinkonzentration vergleichbar war.

Unabhängig vom Aktivierungsprotokoll konnte keine Verschiebung in der Th₁/Th₂-Zytokinausschüttung detektiert werden.

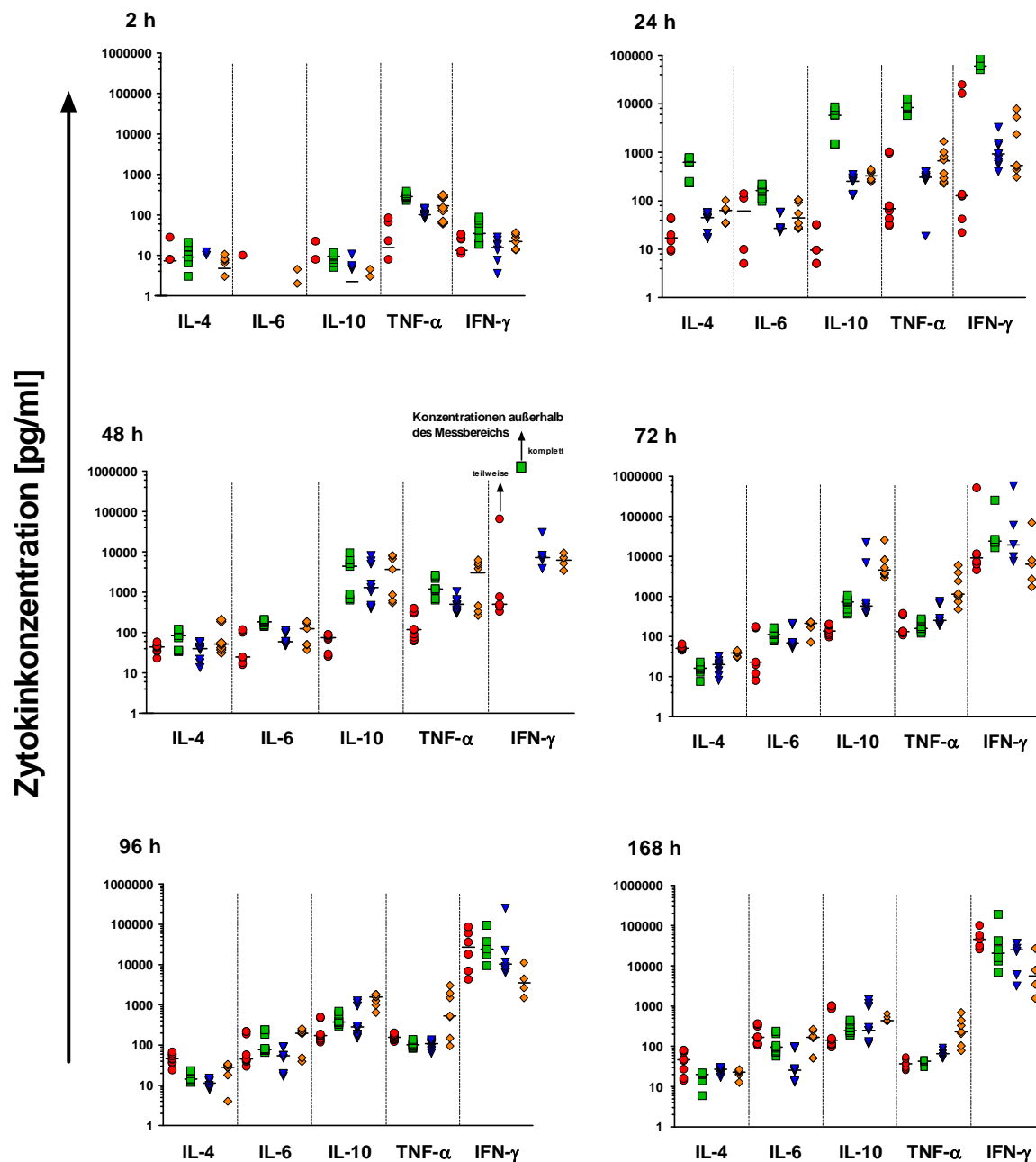


Abbildung 4.15 Zytokinausschüttung unter T-Zellexpansion mit verschiedenen Aktivierungsprotokollen.

Die Zytokinkonzentrationen wurden 2, 24, 48, 72, 96 und 168 h nach Inkulturnahme und Stimulierung mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 (●), Beads beladen mit anti-CD2/CD3/CD28 + 20 U/ml IL-2 (■), Beads beladen mit anti-CD3/CD28 + 20 U/ml IL-2 (▼) und Beads beladen mit anti-CD3/CD28 + 100 U/ml IL-2 (◆) bestimmt. Die Striche zwischen den einzelnen Messwerten markieren den Median. Ist kein Median dargestellt, beträgt sein Wert null. Die T-Zellen stammten von je 3 verschiedenen Spendern pro Protokoll gemessen und sowie wenn möglich dargestellt im Triplikat. Die Zytokinkonzentration wurde entsprechend der in der Kultur vorhandenen Zellzahl zum Vergleich angepasst. Werte > 5000 pg/ml wurden extrapoliert.

4.8 Expansion von CD34⁺ Stammzellen in T-Zellmedien

In den ersten klinischen Studien mit Suizidgen transduzierten T-Zellen wurden mononukleäre Zellen zur Transduktion verwendet. Durch die Wahl des Mediums und dessen Zusätze zur spezifischen Stimulierung der T-Zellen sollte die Kultur schließlich auch nur noch aus T-Zellen bestehen. Es verbleiben jedoch auch andere Populationen in der Kultur wie z.B. hämatopoetische Stammzellen, die sich zu einem geringen Anteil im peripheren Blut befinden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mit selektierten T-Zellen durchgeführt, um die Sicherheit der Gentherapie zu erhöhen. Die Isolierung und Kultivierung CD3⁺ Zellen hatte keinen Nachteil auf das Überleben im Vergleich mit Ficoll getrennten MNZ (Abbildung 4.5).

Um zu untersuchen, ob sich Stammzellen unter T-Zellstimulierung von Ficoll getrennten MNZ expandieren lassen, wurden periphere Blutstammzellen (PBSC) ficollisiert und in Kultur genommen. Wenn die ficollisierten PBSC nicht genügend Stammzellen enthielten, wurden außerdem die verbliebenen Restmengen der CD34 Selektion aus den Qualitätskontrollröhrchen nach Freigabe von Stammzelltransplantaten anonymisiert verwendet. Ein entsprechendes Ethikvotum lag vor.

So befanden sich genügend Stammzellen in der Kultur, die über den Oberflächenmarke CD34 identifizierbar waren, um eine Expansion verfolgen zu können.

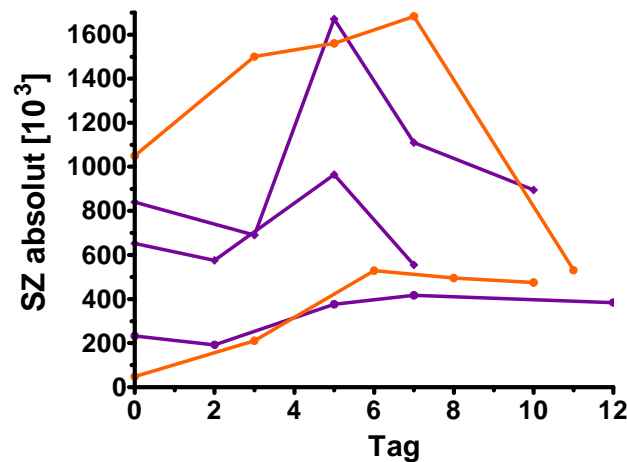


Abbildung 4.16 Expansion von Stammzellen unter T-Zellstimulierungsprotokollen. Die verbliebenen Restmengen PBSC wurden ficollisiert und mit löslichen Antikörpern + 1000 U/ml IL-2 (—) oder anti-CD3/CD28 Beads + 100 U/ml IL-2 (—) stimuliert. Die Expansion von CD34⁺ Stammzellen (SZ) unter T-Zellstimulierung wurde über 12 Tage bestimmt.

Während unter Stimulierung mit den Beads-gekoppelten Antikörpern die Stammzellen zunächst ab- und dann erst ab Tag 2 zunahm, stieg die Zahl nach Aktivierung mit den löslichen Antikörpern sofort ab Inkulturnahme.

Ab Tag 5 oder teilweise auch erst später fiel die Zahl der Stammzellen dann aber rapide ab. Dieser Abfall stand auch in Verbindung mit einer stark sinkenden Vitalität. Die Vitalität sank im Median von 89% auf 28% innerhalb der ersten 7 Tage.

Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass auch in unstimulierten Apheresaten oder peripherem Blut residuale Stammzellen unter einem T-Zellstimulierungsprotokoll proliferieren. Beim Einsatz eines unselektierten Ausgangsmaterials zur Suizidgenstrategie besteht dann die Gefahr, dass hämatopoetische Stammzellen transduziert werden (insbesondere wenn an den Tagen 3, 4 und 5 transduziert wird) und durch Insertionsmutagenese klonal entarten.

5. Diskussion

Akute Leukämien sind die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Insbesondere für die lymphatische Form sind die Heilungschancen heute sehr groß. Betrachtet man alle zwischen 1980 und 2003 beim Deutschen Kinderkrebsregister gemeldeten lymphatischen Leukämien, so ist eine 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 78% zu verzeichnen (Kaatsch *et al.* 2004). Die 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit aller malignen Erkrankungen zusammen liegt bei 72%. Unterdurchschnittliche Heilungschancen haben Kinder mit nicht-lymphatischen Leukämien. Obwohl seit Ende der 70er Jahre die Überlebenswahrscheinlichkeit und das krankheitsfreie Überleben (DFS; *disease free survival*) deutlich verbessert werden konnten (Creutzig, *et al.* 2005), liegt die 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit nur bei 47%.

Zur Verbesserung der Heilungschancen trug die Intensivierung der Chemotherapie, aber auch die Einführung der Stammzelltransplantation (SZT) bei. Jedoch stellt die Toxizität der allogenen SZT nach wie vor ein Problem dar (Georges und Storb 2003, Moore und Sakamoto 2005). Zum einen wird der Patient durch die Konditionierung in die Aplasie gedrängt und ist damit hochgradig gefährdet mit Hinblick auf infektiöse Komplikationen. Zum anderen kann das Transplantat abgestoßen werden oder die residualen T-Zellen im Transplantat können das gesunde Gewebe des Patienten angreifen. Beim letzteren entwickelt sich eine GVHD, die auch tödlich verlaufen kann. Um diese schwerwiegende Nebenwirkung der allogenen SZT zu verhindern, können die T-Zellen aus dem Transplantat depletiert werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, die T-Zellen vor Transplantation zu isolieren und genetisch so zu verändern, dass sie mit einem effektiven Suizidmechanismus ausgestattet sind. In ersten klinischen Studien mit Erwachsenen konnte gezeigt werden, dass die Suizidstrategie grundsätzlich funktioniert (Bonini, *et al.* 1997, Link, *et al.* 1999, Tiberghien 2001). Als Suizidgen wurde die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus I (HSV-TK) in Verbindung mit einem Selektionsmarker eingesetzt. Als Selektionsmarker zur Aufreinigung der transduzierten Zellen diente entweder ein Gentamycin Resistenzgen oder das Gen für den transmembranären Rezeptor LNGFR (*low affinity nerve growth factor-receptor*), wobei die immunomagnetische Anreicherung über einen Oberflächenmarker wahrscheinlich besser ist als über ein Resistenzgen. Durch die Kultivierung der transduzierten Zellen in Gentamycin über 8 Tage scheinen sich die EBV-spezifischen T-Zellen zu verlieren, während dies durch Aufreinigung über eine Säule nicht der Fall ist (Sauce, *et al.* 2002).

Weitere Suizidkonstrukte werden derzeit erforscht. Für die klinische Anwendung ist insbesondere das CD20 Gen interessant. Dieses Oberflächenantigen bietet sich einerseits zur Selektion der transduzierten Zellen an, andererseits kann es als Suizidgen fungieren. Als Suizidinduktor wird der Antikörper Rituximab (Mabthera®) verwendet, der als Fertigarzneimittel zur Behandlung des Lymphoms zugelassen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde als therapeutisches Transgen die HSV-TK verwendet, fusioniert an den Oberflächenmarker tCD34. Die Selektion der transduzierten Zellen über CD34 bietet den Vorteil, dass hierfür immunomagnetische Beads zur klinischen Anwendung zur Verfügung stehen. Das Suizidgen HSV-TK erwies sich bereits in klinischen Studien als sicher. Der verwendete Virusüberstand wurde GMP-konform produziert, so dass die Bedingungen für eine klinische Anwendung diesbezüglich erfüllt waren. Diese Bemühungen lagen darin begründet, dass die T-Zellfunktionalität möglichst unter klinischen Bedingungen untersucht werden sollte, so dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse in die Klinik gewährleistet ist. Entsprechend wurden auch das Medium und die Zusätze ausgewählt. Die Beads aus dem T Cell Activation/Expansion Kit von Miltenyi sind zwar noch nicht für die klinische Anwendung zugelassen, die Firma strebt eine entsprechende Zulassung jedoch an. Mit Ausnahme des löslichen mAb CD28, der nicht als *clinical grade* zur Verfügung steht, sind alle Zusätze für die Klinik zugelassen. Das Medium ist ebenso klinisch zugelassen und wurde so ausgewählt, dass weder ein Antibiotikum noch der Farbindikator Phenolrot enthalten ist.

5.1 Isolierung und Expansion primärer humaner T-Zellen

In den genannten klinischen Studien fand keine CD3 Selektion zur Isolierung der T-Zellen statt, sondern es wurden mononukleäre Zellen (MNZ) kultiviert, die über eine Ficoll-Dichtegradiententrennung gewonnen wurden. Unter den MNZ können sich auch hämatopoetische Stammzellen befinden, die dann transduziert werden könnten. Wie einleitend beschrieben, birgt die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen das Risiko einer Entartung durch Insertionsmutagenese. Natürlich lässt sich eine Entartung auch bei T-Zellen nicht ausschließen, da die retrovirale Genföhre zu 50% innerhalb von Genen und zu 32% in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten integriert wird (Giordano, *et al.* 2006). Bis heute wurde zwar kein einziger Fall einer Leukämie durch Insertionsmutagenese in

transduzierten T-Zellen publiziert, aber es ist auf jeden Fall sicherer, die T-Zellen anzureichern statt eine gemischte Zellpopulation zu transduzieren. Auch wenn sich durch die T-Zell-spezifische Stimulierung fast nur noch T-Zellen in der Kultur befinden, ist die Aktivierung von MNZ mit Unsicherheiten verbunden. Zum einen befinden sich in der DLI viele tote Zellen, die sich durch eine Ficoll-Separation nicht komplett abtrennen lassen. Es ist nicht klar, ob tote Zellen bzw. eventuell freigewordene Zytokine dem Patienten schaden können. Auf keinen Fall nützen sie ihm. Zum anderen werden auch andere Zellpopulationen mit der DLI infundiert, die nur in einer klinischen Studie charakterisiert wurden. Nach einem zwölf-tägigen Manipulationsprozess einschließlich Aktivierung, Transduktion und Selektion befanden sich unter den genmodifizierten Zellen (GMC; *gene modified cell*) 90,5% T-Zellen im Median (Bereich 71,4-97,2) und hauptsächlich NK-Zellen (Tiberghien, *et al.* 2001). Die Kontamination mit Stammzellen wurde nicht untersucht. Wenn sich jedoch Stammzellen in der manipulierten DLI befänden, lägen sie möglicherweise unter der Nachweisgrenze, die für die Durchflusszytometrie bei ca. 10^{-3} - 10^{-4} Zellen liegt (Lion und Kovar 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass $CD34^{+}$ Stammzellen unter den eingesetzten T-Zellstimulierungsprotokollen in den ersten Tagen der Kultivierung nachweisbar und vital waren bzw. geringfügig expandierten (Abbildung 4.16).

Die T-Lymphozyten ließen sich in der vorliegenden Arbeit im klinischen Maßstab in hoher Reinheit isolieren, wobei kein Unterschied zwischen der Aufreinigung über immunomagnetische CD3 und CD4/CD8 Antikörper festzustellen war. Die Selektion über CD4/CD8 ist zwar doppelt so teuer, weil zwei Reagents eingesetzt werden müssen. Dennoch ist die CD4/CD8 Selektion der CD3 Selektion eindeutig vorzuziehen, da hierbei der T-Zellrezeptor *untouched* bleibt, und keine Interferenz mit der Aktivierung über CD3 stattfinden kann. Die Ausbeute war über CD4/CD8 sogar höher als über CD3 (63 vs. 55%; Tabelle 4.1). Die Expansion der isolierten T-Zellen war vergleichbar mit dem Wachstum der $CD3^{+}$ Zellen in einer MNZ Kultur (Abbildung 4.5). Insgesamt war die Expansion der $CD3^{+}$ T-Zellen, die mit Beads-gekoppelten Antikörpern aktiviert worden waren, eher gering (im Median 2-3fache Expansion als Maximum). Im Gegensatz dazu konnten die $CD3^{+}$ T-Zellen mit den löslichen Antikörpern so stark aktiviert werden, dass die Expansionsrate an Tag 14 bei 40 im Median mit steigender Tendenz lag.

In einer Studie mit „X-cyte Beads“ (Bead/Zell-Verhältnis 3:1), die mit CD3 und CD28 mAb beladen waren, konnte eine doppelt so hohe Expansionsrate erzielt werden (6,3fach an Tag

10). Gleichzeitig konnte mit löslichen CD3 und CD28 mAb nur eine Expansionsrate von 3,6 erreicht werden. Die IL-2 Konzentration war bei beiden Protokollen 200 U/ml (Bondanza, *et al.* 2005). In einer anderen Studie wurden anti-CD3/CD28 „Dynal-Beads“ (Bead/Zell-Verhältnis 1:1) + 20 U/ml IL-2 verwendet. Die aktivierten T-Zellen expandierten 20fach innerhalb von 14 Tagen (Trickett und Kwan 2003). In einen Großansatz von Orchard *et al.* expandierten die T-Zellen um das 43fache bis Tag 13 (Orchard, *et al.* 2002), während in einer anderen Arbeitsgruppe sogar noch höhere Expansionsraten erreicht wurden. Nach Aktivierung mit „X-cyte Beads“ (Bead/Zell-Verhältnis 1:1) zeigten die T-Zellen eine > 100fache Expansion innerhalb von 10 Tagen (Kalamasz, *et al.* 2004). Die Expansionsdaten aus den unterschiedlichen Arbeitsgruppen sind sehr heterogen und aus verschiedenen Gründen nur schwer miteinander vergleichbar. Zum einen stellt sich die Frage nach der Messmethodik: In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte „single-platform“-Methode angewandt, d.h. mit nur einer Analyse im Durchflusszytometer (CD45-FITC/CD3-PE/7AAD) wurden die toten Zellen ausgeschlossen und damit nur die vitalen T-Zellen mit Hilfe eines internen Standards (Flow-Count™ Fluorospheres) gezählt. Dadurch, dass die toten Zellen parallel zum Zählprozess ausgeschlossen wurden, ist die Fehleranfälligkeit deutlich geringer als mit einem hämatologischen Zählgerät (z.B. Coulter-Counter) oder der Trypanblaufärbung unter Verwendung der Neubauer-Kammer. In den o.g. Studien wurde entweder ein hämatologisches Zählgerät oder die Trypanblaufärbung in Verbindung mit einer durchflusszytometrischen Analyse angewandt, so dass sehr starke Ungenauigkeiten bestehen könnten.

Zum anderen bestehen sehr starke interindividuelle Unterschiede zwischen der Expansionsfähigkeit der T-Zellen von unterschiedlichen Spendern. In der vorliegenden Arbeit wurden immer verschiedene Spender gewählt und die schwachen Expansionsdaten nicht von der Gesamtanalyse ausgeschlossen. Außerdem ließen sich die T-Zellen desselben Spenders isoliert an verschiedenen Zeitpunkten auch sehr unterschiedlich expandieren, so dass auch beträchtliche intraindividuelle Unterschiede zu berücksichtigen sind. Interexperimentell ergaben sich zum Teil enorme Unterschiede: Die Standardabweichung betrug bis zu 150% der Mittelwerte. Ähnlich starke Schwankungen wurden schon von anderen beobachtet (Qasim, *et al.* 2003), und in einer klinischen Studien konnten sogar drei Patienten nicht mit der vorgesehenen DLI behandelt werden, weil sich die T-Zellen überhaupt nicht expandieren ließen (Burt, *et al.* 2003).

Des Weiteren erscheint das aktuell vorliegende Protokoll der Firma Miltenyi zur Aktivierung und Expansion von T-Zellen (*T Cell Activation/Expansion Kit*) noch nicht ausgereift. Die IL-2 Konzentration sollte von 20 auf 50-100 U/ml erhöht werden, und die Zugabe sollte schon an Tag 0 erfolgen. Dadurch könnte ein anhaltender Proliferationsstimulus erreicht werden. Insgesamt konnte demonstriert werden, dass die T-Zellen IL-2 abhängig wachsen, wobei dieser positive IL-2 Effekt stärker bei der Stimulierung mit den löslichen Antikörpern zur Geltung kam. Es muss geschlussfolgert werden, dass die hohen Expansionsraten auch durch die löslichen Antikörper per se ausgelöst wurden.

Sehr wahrscheinlich ist das im Protokoll angegebene Bead/Zell-Verhältnis von 1:2 zu gering. Insbesondere wenn in einer Zellkulturflasche oder im Beutel expandiert werden soll, erscheint das Verhältnis zu klein, da sich die Beads und die Zellen in einem großen Volumen schlechter finden. Auf Nachfrage bei der Firma Miltenyi wurde mitgeteilt, dass die Versuche in deren Labor hauptsächlich in Lochplatten mit einem kleinen Volumen durchgeführt wurden.

In Bezug auf das Bead/Zell-Verhältnis besteht für die Beads der Firma Miltenyi sicherlich noch Forschungsbedarf.

Alternativ zur Expansion der T-Zellen könnte auch eine ausreichend hohe Zellzahl von Beginn an transduziert werden, um eine DLI für die Suizidstrategie herzustellen. Hierdurch würde auch das Problem umgangen werden, dass sich die T-Zellen nicht von jedem Spender expandieren lassen. Sicherlich würde diese Vorgehensweise einen hohen logistischen wie finanziellen Aufwand bedeuten, da für einen sicheren GvL-Effekt ca. 1×10^8 Zellen/kg Körpergewicht benötigt werden (Shiobara, *et al.* 2001). Bei einem Kind mit 50 kg Körpergewicht entspricht das einer Zellmenge von 5×10^9 Zellen absolut, so dass bei einer mittleren Transduktionseffizienz von 10% von Beginn an 5×10^{10} Zellen transduziert werden müssten. Bei einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml entspräche das einem Volumen von 20 l. In den ersten klinischen Studien sowie in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zur Transduktion eine Zellkonzentration von nur 1×10^6 /ml gewählt, so dass das anfängliche Volumen auf 50 l verdünnt werden müsste. Um diese große Menge handhaben zu können, müsste zum einen die Virusproduktion automatisiert werden. Die Transduktionseffizienz dürfte jedoch nicht zu sehr erhöht werden, auch wenn sich dadurch die anfängliche Zellzahl deutlich reduzieren ließe. Denn bei einer Transduktionseffizienz von $> 30\%$ muss davon ausgegangen werden, dass pro Zelle mehr als eine Vektorintegration stattgefunden hat (Fehse, *et al.* 2002). Das gilt es aus Sicherheitsgründen zu verhindern. Zum anderen müssten Material

(Zellkulturflaschen oder Beutel) und Geräte (Zentrifugen) mit entsprechender Kapazität entwickelt werden. Dieser Tatsache ist sich die Industrie bewusst und teilweise werden auch schon Lösungen angeboten.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Beads-gekoppelten Antikörper in Kombination mit einer geringen IL-2 Konzentration besser zur Stimulierung eignen würden, wenn die T-Zellen 1-2 Tage nach Inkulturnahme und Aktivierung transduziert werden sollen, da die Zellen ab Tag 0 anfangen zu proliferieren. Im Gegensatz dazu fiel die Zellzahl zunächst ab und stieg erst wieder zwischen Tag 2 und 4, wenn mit Beads-gekoppelten Antikörpern in Verbindung mit einer hohen IL-2 Konzentration oder löslichen Antikörpern stimuliert wurde (Abbildung 4.4).

5.2 Der immunologische Phänotyp der expandierten und transduzierten T-Zellen

Bezüglich des immunologischen Phänotyps wäre es sinnvoll, von Beginn an eine ausreichend große Menge T-Zellen zu transduzieren und auf eine Expansion zu verzichten. Denn innerhalb der ersten 5 Tage finden starke Veränderungen im Phänotyp statt. Zwar lassen sich aus dem immunologischen Phänotyp lediglich theoretische Rückschlüsse auf die tatsächliche Funktionalität ziehen. Aber aufgrund der Tatsache, dass es sehr schwierig ist, die Funktionalität *in vitro* zu bestimmen, gilt es als allgemein anerkannt, sich entsprechender Surrogatparameter zu bedienen. Neben der Bestimmung der T-Zellsubpopulationen werden als Surrogatparameter die Untersuchung der Polyklonalität des T-Zellrezeptors (Coito, *et al.* 2004), die Zytokinausschüttung (Marktel, *et al.* 2003) und die Anwesenheit bzw. der Erhalt antigenspezifischer T-Zellen (Sauce, *et al.* 2002) verwendet.

Unabhängig davon, ob in der vorliegenden Arbeit lösliche Antikörper oder Beads-gekoppelte Antikörper zur Stimulierung der T-Zellen verwendet wurden, fand eine Verschiebung vom naiven zum Gedächtniszellphänotyp statt. Außerdem befanden sich früh und spät aktivierte T-Zellen in der Kultur, während die naiven Subpopulationen auf < 10% zusammenschrumpften. Es wurden auch die Lymphozytensubpopulationen vor und nach Transduktion bestimmt. Da zur Transduktion ein HSV-TK/CD34 Vektor verwendet wurde, konnten die transduzierten T-Zellen über den Oberflächenmarker CD34 durchflusszytometrisch identifiziert werden; Nicht

transduzierte T-Zellen blieben CD34⁻. Nach Transduktion befanden sich in der transduzierten CD34⁺ Population nur sehr wenige naive CD4⁺CD45RA⁺, aber mehr (nach Aktivierung mit den löslichen Antikörpern) oder zumindest genauso viele (nach Aktivierung mit den Beads-gekoppelten Antikörpern) CD8⁺CD45RA⁺CD28⁺ Zellen.

Besonders auffällig war, dass die Stimulierung mit den löslichen Antikörpern dazu führte, dass hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen transduziert wurden. Im Gegensatz dazu konnten die T-Zellen, die mit den Beads-gekoppelten Antikörpern aktiviert wurden, hinsichtlich des T-Helfer und des T-Suppressor Kompartiments homogen transduziert werden (Abbildungen 4.11 und 4.12). Die Aktivierung mit den löslichen Antikörpern regte offensichtlich die CD8⁺ T-Zellen stärker zur Proliferation an als die CD4⁺ T-Zellen. Dies ließ sich auch aus der starken Reduzierung des CD4/CD8 Quotienten ableiten. Je stärker die Zellen proliferieren, desto besser kann die retrovirale Genfahre in den Zellkern eindringen bzw. die Wahrscheinlichkeit ist höher, dass das Virus in den Zellkern gelangt. Ähnlich verhält es sich wahrscheinlich mit den naiven T-Zellen. Lamana et al. hatten schon früher gezeigt, dass CD45RA⁺CCR7⁺ T-Zellen nur schwer zu transduzieren sind (Lamana, *et al.* 2004).

Zu den regulatorischen T-Zellen gehören die NKT-Zellen (CD3⁺CD56⁺) und T-regs (CD4⁺CD25⁺). Die letzteren sind zwar durch die Expression von CD4 und CD25 charakterisiert, stellen aber nur eine Subgruppe der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen dar. Diese Subgruppe, die CD25 sehr hoch exprimiert (CD25⁺^{bright}), besitzt immunologische Suppressoreigenschaften und wird deswegen auch als „Regulatorische T-Zellen“ (T-regs) bezeichnet. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass T-regs die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten unterbinden und damit einen vielversprechenden therapeutischen Wert für Patienten in der Rheumatologie einnehmen könnten (Loser und Beissert 2006). Bei der SZT scheinen die T-regs das Anwachsen des Transplantats zu fördern und gleichzeitig das Risiko einer GVHD zu mindern (Hoffmann, *et al.* 2005, Tiberghien, *et al.* 1997). Die übrigen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zeigen jedoch eher alloreaktive Eigenschaften und fördern die Entwicklung einer GVHD. In einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) exprimieren die T-Zellen vermehrt CD25. Das Oberflächenmolekül CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors und stellt damit auch einen Aktivierungsmarker dar. In einer klinischen Studie mit haploident-transplantierten pädiatrischen Patienten konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit einem CD25-spezifischen Immunotoxin das Auftreten einer schweren GVHD verhindert (Andre-Schmutz, *et al.* 2002).

Entsprechend könnten die ex vivo expandierten und transduzierten T-Zellen ein zweischneidiges Schwert darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bei Aktivierung mit den löslichen Antikörpern nach Transduktion nur noch wenige $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in der Kultur befanden. Im Gegensatz dazu war der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^+$ Zellen sehr hoch, wenn mit den Beads-gekoppelten Antikörpern stimuliert wurde. Der hohe Anteil könnte bezüglich der Induktion einer GVHD problematisch sein. Zwar umfassen die $CD25^+$ T-Zellen beide Subpopulationen: Die T-regs, die vor einer GVHD schützen sollen, und die alloreaktiven T-Zellen, die eine GVHD eher auslösen. Da die T-regs $CD25$ jedoch hoch exprimieren und damit im Durchflusszytometer als eine extra Wolke erscheinen, sind sie auch identifizierbar. Diese Wolke war in den entsprechenden Versuchen nicht erkennbar, so dass von aktivierten T-Zellen ausgegangen werden muss. Diese Annahme würde auch mit der Expression des $CD25$ Moleküls auf anderen Subpopulationen korrelieren (doppeltpositive Zellen).

In den ersten klinischen Studien mit Suizidgen transduzierten T-Zellen wurde v.a. mit dem löslichen Antikörper $CD3$ und $IL-2$ stimuliert, wobei die Inzidenz der GVHD deutlich niedriger als erwartet war. Dieser Umstand könnte teilweise darauf zurückgeführt werden, dass sich hauptsächlich Gedächtniszellen (Verschiebung von naiven zu Gedächtniszellen in Kultur) und wenige alloreaktive T-Zellen ($CD25^+$) in der DLI befanden.

Neben den T-regs haben auch NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+$) regulatorische Eigenschaften. Eine Arbeitsgruppe aus den Vereinigten Staaten, Kalifornien zeigte mit verschiedenen Studien in der Maus, dass NKT-Zellen das Risiko einer GVHD nach Knochenmarktransplantation vermindern können (Lan, *et al.* 2003, Lan, *et al.* 2001, Zeng, *et al.* 1999). Die NKT-Zellen induzieren durch die Ausschüttung von $IL-4$ eine Verschiebung zur Th_2 -Immunantwort. Die Th_1 -Antwort wird unterdrückt und eine GVHD kann sich nicht entwickeln oder aufrechterhalten werden. Einen ähnlichen Zusammenhang hat auch eine Arbeitsgruppe in Frankreich gefunden. Die NKT-Zellen konnten in der Maus vor Autoimmunkrankheiten schützen, wobei die Sekretion von $IL-10$ eine besondere Rolle spielte (Miellot, *et al.* 2005).

Der GVHD protektive Effekt konnte sogar bereits in einer klinischen Studie gezeigt werden. Durch die Bestrahlung des lymphatischen Gewebes sollte die Zahl der zirkulierenden NKT-Zellen im Patienten erhöht werden. In der Folge konnten sehr hohe $IL-4$ Spiegel gemessen werden, die vermutlich auf die NKT-Zellen zurückzuführen waren. Von 37 Patienten

entwickelten nur 2 eine akute GVHD. Trotz der geringen GVHD Inzidenz erschien der GvL-Effekt nicht reduziert (Lowsky, *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten NKT-Zellen IL-2 abhängig expandiert werden. Diese IL-2 Abhängigkeit wurde auch schon früher von einer anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Klingemann und Martinson 2004). Die induzierte Proliferation macht die NKT-Zellen leicht zugänglich für den retroviralen Gentransfer. Nach Aktivierung mit den Beads-gekoppelten Antikörpern befanden sich die NKT-Zellen sogar nur noch in der CD34⁺ Population nach Transduktion. Parallel konnte unter Expansion eine erhöhte IL-4 Sekretion beobachtet werden, so dass es sich bei den CD3⁺CD56⁺ Zellen tatsächlich um regulatorische NKT-Zellen handeln könnte. Andererseits konnten wir keine Verschiebung in der Ausschüttung von Th₁- zu Th₂-Zytokinen feststellen.

5.3 Antgenspezifische T-Zellen und Zytokinausschüttung

Unabhängig davon, ob mit den löslichen oder den Beads-gekoppelten Antikörpern stimuliert wurde, konnten die CMV-spezifischen CD3⁺CD8⁺ T-Zellen erhalten bleiben. Im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation ist es von großer Bedeutung, dass im Transplantat oder in der DLI auch CMV-spezifische T-Zellen enthalten sind, wenn Spender oder Empfänger CMV-seropositiv ist. Die antigenspezifischen T-Zellen können eine Reaktivierung der viralen Erkrankung verhindern. Da die Patienten nach Transplantation nahezu vollständig immunsupprimiert sind, stellt eine akute CMV-Infektion schon eine schwere Komplikation dar.

Unter Stimulierung mit den löslichen Antikörpern expandierten in der vorliegenden Arbeit die CMV-spezifischen T-Zellen am stärksten. Dieses Phänomen korrelierte auch mit der hohen Expansionsrate der CD3⁺ T-Zellen insgesamt (Abbildung 4.4). Außerdem bewirkten die löslichen Antikörper eine stärkere Proliferation der CD8⁺ Zellen, zu denen auch die antigenspezifischen T-Zellen gehören. Die Anwesenheit der CMV-spezifischen T-Zellen sagt jedoch nichts über deren Funktion aus. Da die T-Zellen, die mit den löslichen Antikörpern aktiviert worden waren, die geringste Zytokinproduktion unter Expansion zeigten, ist es fraglich, ob die Zellen überhaupt aktiv sind. Lediglich IFN- γ wurde über 168 h ähnlich stark sezerniert wie von den über Beads stimulierten T-Zellen. Es ist bekannt, dass eine hohe IL-2 Konzentration (die löslichen Antikörper wurden in Kombination mit 1000 U/ml IL-2

verwendet) eine starke IFN- γ Produktion auslöst (Contassot, *et al.* 1998). Unbekannt ist jedoch, welche Rolle IFN- γ schließlich spielt. Einerseits ist IFN- γ wichtig für die Bekämpfung viraler Infektionen. Andererseits gibt es einen Zusammenhang zwischen der IFN- γ Ausschüttung aktivierter T-Zellen und Apoptose (Novelli, *et al.* 1994).

Als mit den Beads-gekoppelten Antikörpern stimuliert wurde, expandierten die CMV-spezifischen T-Zellen nur wenig oder erholten sich innerhalb von 12 Tagen gerade auf die Ausgangskonzentration. Die meisten Messungen der CMV-spezifischen T-Zellen wurden nur über 12 statt über 14 Tage wie bei den übrigen Experimenten durchgeführt, da das entsprechende Kit sehr teuer ist und nach Tag 12 keine gravierenden Änderungen mehr aufgetreten waren. Die Expansion der CMV-spezifischen Zellen korrelierte auch mit der Expansion der CD3⁺ T-Zellen insgesamt. Gleichzeitig zeigen die T-Zellen, die über Beads aktiviert wurden, eine starke Zytokinproduktion. Eine starke Zytokinproduktion spricht für den Erhalt der Funktionalität der T-Zellen. Hinsichtlich der Funktionalität der antigenspezifischen T-Zellen gegen CMV muss jedoch berücksichtigt werden, dass antigenspezifische T-Zellen nur eine sehr kleine Subpopulation darstellen und damit auch nur eine geringe Menge zur Zytokinausschüttung beitragen. Das heißt aus der Zytokinausschüttung der gesamten T-Zellen lassen sich letztendlich kaum Rückschlüsse auf die Funktionalität CMV-spezifischer T-Zellen ziehen.

Bezüglich der Expansion CMV-spezifischer T-Zellen wurde in einer Studie von Sauce *et al.* Ähnliches beobachtet (Sauce, *et al.* 2003). Allerdings wurden transduzierte und selektierte T-Zellen expandiert. Außerdem wurde ein anderes Medium mit löslichem CD3 mAb und 500 U/ml IL-2 verwendet. Die CMV-spezifischen T-Zellen nahmen wie in der vorliegenden Studie zunächst ab und expandierten anschließend im gleichen Maß wie die T-Zellen, die in dieser Arbeit mit löslichen CD3, CD28 mAb und 1000 U/ml IL-2 stimuliert wurden (ca. 40fach).

5.4 Die Funktionalität aktivierter und transduzierter T-Zellen

Trotz der Untersuchung der verschiedenen Surrogatparameter für die Beurteilung der Funktionalität von T-Zellen, bleibt es schwierig, die Immunkompetenz einer genmanipulierten DLI zu bestimmen.

Die Beads-gekoppelten Antikörper eignen sich wahrscheinlich besser als die löslichen Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen, um die Immunkompetenz zu erhalten. Die Beads als zellgroße Kügelchen imitieren eine APC und stellen damit einen physiologischeren Stimulus dar als lösliche Antikörper. Als über Beads stimuliert wurde, schütteten die T-Zellen viele verschiedene Zytokine in großen Mengen aus. Außerdem konnte das CD4⁺ und CD8⁺ Kompartiment homogen transduziert werden. Ein physiologisches Verhältnis CD4/CD8 ist sicherlich günstig, um in den immunsupprimierten Patienten eine Wirkung entfalten zu können. Gleichzeitig bestehen die transduzierten Zellen jedoch zum größten Teil aus Gedächtniszellen, und es ist fraglich, ob diese Zellen auf neue Antigene wie die auf leukämischen Blasten reagieren können.

Um dieser Frage nachzugehen, müsste ein In-vitro-Test mit leukämischen Blasten und Suizidgen transduzierten T-Zellen des passenden Spenders durchgeführt werden. Basierend auf NK-Zellen und leukämischen Blasten wurde ein entsprechender Zytotoxizitätstest auch schon entwickelt (Zimmermann, *et al.* 2005). Für T-Zellen erweist sich dieser Test jedoch aus folgenden Gründen als problematisch:

- Die T-Zellen und leukämische Blasten müssen HLA-kompatibel sein, so dass nicht lediglich eine unspezifische Toxizität gemessen wird. Hierbei erweist sich auch die Verfügbarkeit von Patientenmaterial als problematisch – insbesondere bei Kindern
- Es müssen HLA-kompatible APCs in der Kultur vorhanden sein, damit Antigene präsentiert werden können
- Wenn Monozyten als APCs verwendet werden, muss ein Zelllysate der Zielzellen in der Kultur vorhanden sein, da Monozyten nur Fragmente präsentieren, selbst aber keine Zellen lysieren können
- Die zytotoxische Aktivität der T-Zellen ist ein Prozess über mehrere Tage in der Kultur, so dass ein Vergleich mit unstimulierten T-Zellen dahingehend problematisch ist, dass unstimulierte T-Zellen nicht so lange in der Kultur überleben (es sei denn sie werden erfolgreich über die Monozyten stimuliert)

Auch wenn in Zukunft ein solcher Zytotoxizitätstest für T-Zellen entwickelt wird, kann in vitro immer nur ein Teil der physiologischen Verhältnisse abgebildet werden. Es wäre zwingend notwendig, eine positive In-vitro/In-vivo-Korrelation nachzuweisen.

Alternativ zu einem In-vitro-Modell würde sich ein Tiermodell eignen, um die Immunkompetenz der manipulierten T-Zellen zu untersuchen. Vor dem Hintergrund, dass in einer klinischen Studie mit 14 CML Patienten nur 2 auf die Infusion Suizidgen transduzierter Lymphozyten ansprachen und keiner der Behandelten eine GVHD entwickelte, ist es interessant zu untersuchen, welche T-Zelldosis im Tiermodell benötigt wird, um eine GVHD auszulösen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass 10x mehr genmanipulierte als frische T-Zellen benötigt werden, um in der Maus eine 100% letale GVHD zu erzielen. Wenn die 12 Tage kultivierten T-Zellen jedoch noch zusätzlich 2 Tage in einem Medium mit nur 20 U/ml IL-2 „zur Ruhe“ gebracht worden waren, konnte mit der gleichen Menge wie mit frisch isolierten Lymphozyten in 100% der Mäuse eine letale GVHD induziert werden (Contassot, *et al.* 1998).

Auch in einem anderen Labor wurde in der Maus gezeigt, dass aktivierten T-Zellen die Reaktivität, eine GVHD auszulösen, verloren geht. Gleichzeitig blieb die Fähigkeit, das Anwachsen des Transplantats zu unterstützen, erhalten (Drobyski, *et al.* 1998).

Da in der letzt genannten Studie die T-Zellen lediglich expandiert, jedoch nicht genmanipuliert wurden, scheint wirklich nur die Aktivierung, nicht aber die Transduktion und die immunomagnetische Selektion für den Verlust der Immunkompetenz verantwortlich zu sein. Hinweise auf diesen Zusammenhang gab es bereits aus anderen Studien (Contassot, *et al.* 1998, Ferrand, *et al.* 2000, Liebowitz, *et al.* 1998, Sauce, *et al.* 2002, Weijtens, *et al.* 2002). Entsprechend wurde an der Optimierung der Aktivierungsprotokolle gearbeitet. In beiden o.g. Studien von Contassot *et al.* und Drobyski *et al.* wurde zur Aktivierung der T-Zellen nur CD3 mAb und IL-2 eingesetzt. Die Erweiterung des Aktivierungsprotokolls um die Co-Stimulierung über CD28 konnte in der Maus bereits zu einer verbesserten Alloreaktivität führen (van Rijn, *et al.* 2003). Wenn zusätzlich noch die Kulturzeit auf 5-8 Tage verkürzt würde, könnte die Immunkompetenz der T-Zellen in der Suizidgenstrategie sehr wahrscheinlich signifikant verbessert werden (Robinet, *et al.* 2005).

Durch die vorliegende Arbeit wird die Annahme unterstützt, dass die Aktivierung der T-Zellen die entscheidende Rolle in Bezug auf die Immunkompetenz der T-Zellen spielt. Eine Co-Stimulierung über CD28 ist schon allein wichtig, um den AICD zu reduzieren. Darüber hinaus scheint es von Vorteil zu sein, zusätzlich über CD2 zu stimulieren, da hierdurch eine sehr viele höhere Zytokinproduktion erzielt werden konnte. Die Ausschüttung von Zytokinen kann als Hinweis auf eine ungestörte Funktionalität gedeutet werden.

Die Veränderungen des immunologischen Phänotyps der T-Zellen finden innerhalb der ersten 5 Tage statt, so dass trotz einer kurzen Kulturzeit von 5-8 Tagen eine Verschiebung von naiven Zellen zu Gedächtniszellen stattfinden würde. Dennoch ist es mit Hinblick auf die interindividuellen Unterschiede, ob sich die T-Zellen des Spenders *ex vivo* expandieren lassen, sicherlich von Vorteil, die Expansionszeit kurz zu halten und präferentiell ausreichend T-Zellen von Beginn an zu transduzieren.

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass es auch Studien gibt, in denen die *ex vivo* Stimulierung der T-Zellen über Beads-gekoppelte Antikörper gerade dazu verwendet wird, eine DLI wirksamer zu gestalten. Das zugrunde liegende Prinzip soll darin liegen, dass die T-Zellen durch die Aktivierung (mit IL-2 oder auch zusätzlich mit Beads-gekoppelten Antikörpern) vor einer Anergie im Patienten geschützt werden (Slavin, *et al.* 1996). Diese im Patienten induzierte Anergie soll dafür verantwortlich sein, dass die DLI in anderen Erkrankungen als CML weniger wirksam ist. Bei akuten Leukämien waren die Erfolge bisher eher dürftig, während bei CML-Patienten Remissionsraten bis zu 70% erzielt werden konnten (Kantarjian, *et al.* 2000).

Außerdem soll durch die Aktivierung die T-Helferzellfunktion (CD4⁺ T-Zellen) verbessert und damit der GvL-Effekt erhöht werden. Tatsächlich ließen sich in einer Studie durch die Infusion von über 12 Tagen *ex vivo* stimulierten Lymphozyten Erfolge demonstrieren. (Porter, *et al.* 2005). Jedoch erhielten die Patienten simultan auch eine konventionelle DLI, so dass deren Effekte schwer voneinander zu trennen waren. Hier besteht sicherlich noch Forschungsbedarf.

Sinnvoll erscheint die Aktivierung und Expansion von T-Zellen für eine autologe DLI, wenn aus dem Patienten nicht genügend Zellen gewonnen werden können. In einer klinischen Studie mit Patienten, die an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren, konnten die autologen T-Zellen zwar ohne Kontamination maligner Zellen expandiert werden. Ein klinischer Vorteil der Infusion aktivierter T-Zellen konnte aber nicht gezeigt werden (Laport, *et al.* 2003).

6. Ausblick

Die zelluläre Immuntherapie ist ein wachsendes Forschungsgebiet in der Onkologie. In den Siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde bekannt, dass seltene Krebserkrankungen wie z.B. das Kaposi-Sarkom vermehrt bei Patienten mit Immunerkrankungen auftreten. Später zeigte sich zwar, dass die meisten malignen Erkrankungen einen viralen Ursprung hatten; das Kaposi-Sarkom kann als Folge einer Herpeserkrankung (HSV-8) auftreten (List, *et al.* 1987). Aber die Idee, das menschliche Immunsystem im Kampf gegen den Krebs einzubinden, war geboren. Es wurden einzelne Zellpopulationen identifiziert und isoliert, die einen entscheidenden Beitrag zum Antitumor-Effekt des Immunsystems beitragen. Von besonderer Bedeutung sind die NK- und T-Zellen sowie die dendritischen Zellen. Ein Meilenstein für die zelluläre Immuntherapie ist die Einführung der Donor-Lymphozyten-Infusionen. Die Bedeutung des GvL-Effekts konnte eindrucksvoll an Patienten, die nach Stammzelltransplantation einen Rückfall erlitten, gezeigt werden (Kolb, *et al.* 1990). In CML Patienten konnten Remissionsraten bis zu 70% erzielt werden. Schnell stellte sich jedoch heraus, dass die Wirksamkeit bei anderen Erkrankungen, insbesondere bei akuten Leukämien, viel geringer ist. Außerdem ist die Nebenwirkung GVHD stark dosislimitierend. Entsprechend wurde die DLI mit der Suizidstrategie kombiniert und gleichzeitig wird auch am Einsatz anderer Zellpopulationen geforscht. Hierbei spielen NK-Zellen eine besondere Rolle. Sie erkennen hauptsächlich hämatopoetische Zellen des Empfängers und unterstützen das Anwachsen des Transplantats wahrscheinlich ohne eine GVHD auszulösen (Passweg, *et al.* 2005). In jüngster Zeit sind auch die dendritischen Zellen Gegenstand der Forschung, um die Immunantwort im Patienten zu verbessern (Aloysius, *et al.* 2006).

Es hat sich jedoch als problematisch herausgestellt, die Funktion der Zellen auch in der Zellkultur aufrechtzuerhalten. Zu komplex erscheint das physiologische Wechselspiel zwischen Zellen und Botenstoffen im Körper, um es in der Zellkultur nachzuahmen. Dies gilt auch für die genetisch veränderten T-Zellen in der Suizidstrategie. Um die zelluläre Immuntherapie effizienter einsetzen zu können, müssen die biologischen Zusammenhänge noch besser verstanden und auch ex vivo umgesetzt werden. Für die klinische Suizidstrategie gilt, die ex vivo Zellkulturbedingungen zu optimieren – wie in der vorliegenden Arbeit schon in vitro geschehen. Auf Beads gekoppelte Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen sind den herkömmlichen Protokollen überlegen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Beads der Firma Miltenyi getestet, doch auf dem Markt wird noch ein anderes Produkt angeboten

(Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 von Invitrogen). Diese magnetischen Beads tragen die Antikörper kovalent gebunden auf der Oberfläche. Dadurch können die T-Zellen simultan zur Aktivierung immunomagnetisch isoliert werden. Der Vorteil der Beads gekoppelten Antikörper gegenüber löslichen Antikörpern, wie in der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet, beruht wahrscheinlich auf der Imitation einer APC. Entsprechend müssten die Beads der verschiedenen Firmen ähnliche Eigenschaften aufweisen und austauschbar sein. Das heißt in Zukunft könnte eventuell auch auf die Dynabeads umgestiegen werden, um die Generierung genmanipulierter Zellen zu vereinfachen.

Ein anderer Forschungsbereich ist die Vektorforschung für den Gentransfer. In allen klinischen Studien mit Suizidgen transduzierten T-Zellen wurden retrovirale Genfähren verwendet. Alternativ können auch lentivirale Vektoren genutzt werden (Thomas, *et al.* 2003). Der lentivirale Infektionsmechanismus bietet den Vorteil, dass sich die Zielzellen nicht teilen müssen, damit das therapeutische Gen in die DNA integriert werden kann. Das Virus besitzt einen aktiven Transportmechanismus, mit der es die Zellkernmembran überwinden kann (Bukrinsky, *et al.* 1992). Auf die Aktivierung der T-Zellen kann dennoch nicht ganz verzichtet werden. Da die Aktivierung aber keine starke Proliferation induzieren muss, sondern die T-Zellen nur in die G₁-Phase bringen, ist der Einfluss auf Immunkompetenz wahrscheinlich geringer (Cavalieri, *et al.* 2003). Ob lentivirale Vektoren zukünftig retrovirale Genfähren ersetzen, ist offen. Gleichzeitig bestehen sehr große Sicherheitsbedenken, da sich die Vektoren vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) ableiten. Es wäre ein medizinischer GAU, wenn sich bei einer Gentherapie im Menschen ein neues Immundefizienzvirus bilden würde. Unabhängig davon ist noch lange nicht geklärt, ob die ex vivo Kulturbedingungen für T-Zellen im Rahmen lentiviraler Transduktionen den Bedingungen für retrovirale Transduktionen überlegen sind.

7. Zusammenfassung

Für pädiatrische Patienten mit Hochrisikoleukämien ist die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) eine etablierte Therapieform, um nach Stammzelltransplantation die Immunrekonstitution zu verbessern oder ein beginnendes Rezidiv abzuwehren. Als schwerwiegende Nebenwirkung kann jedoch eine „Graft-versus-host“-Krankheit (*graft-versus-host disease*; GVHD) auftreten, bei der die T-Zellen gesundes Gewebe angreifen. In ersten klinischen Studien mit veränderten, Suizidgen tragenden Donor-Lymphozyten konnte durch die rechtzeitige Gabe eines Suizidinduktors die GVHD unterbunden werden. Die genetische Manipulation der T-Zellen führte jedoch zu einem Funktionsverlust, der vermutlich auf die zur Transduktion notwendige Aktivierung zurückzuführen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aktivierungsprotokolle mit Beads-gekoppelten oder löslichen Antikörpern hinsichtlich der Expansionsrate und dem Einfluss auf die Funktionalität der T-Zellen näher untersucht. Dazu wurden primäre humane T-Zellen im klinischen oder im Labormaßstab immunomagnetisch über eine CD3 sowie CD4/CD8 Selektion oder mittels der RosetteSep-Prozedur auf > 96% angereichert und anschließend expandiert. Die Transduktion erfolgte an den Tagen 3 und 4 mit einem „GMP-grade“ CD34/HSV-TK Vektor. Zur Aktivierung wurden zum einen lösliche CD3/CD28 Antikörper und zum anderen zellgroße Kügelchen - sogenannte Beads – verwendet. Die Beads wurden mit CD3/CD28 Antikörper und fakultativ mit CD2 beladen. Die beladenen Beads imitieren in der Zellkultur eine Antigen präsentierende Zelle (*antigen presenting cell*; APC) und sollten damit eine möglichst physiologische Situation schaffen. Außerdem wurden unterschiedliche IL-2 Konzentrationen zugesetzt (20-1000 U/ml), um einen potentiellen IL-2 Effekt auf die T-Zellen zu untersuchen.

Die Aktivierung mit den löslichen Antikörpern führte zu einer IL-2 abhängigen Proliferation der T-Zellen über 14 Tage mit maximaler Expansionsrate (47fach) bei 1000 U/ml IL-2. Die Expansion mit Beads-gekoppelten Antikörpern war ebenfalls IL-2 abhängig, beschränkte sich jedoch auf die erste Woche und erreichte eine maximale Expansionsrate von 3-4. In der zweiten Woche fiel die Zellzahl ab. Der Einsatz des CD2 Antikörpers bewirkte einen zusätzlichen Proliferationsreiz. Zusammenfassend sind für eine starke Expansion der T-Zellen eine hohe IL-2 Konzentration, aber auch die löslichen Antikörper per se verantwortlich. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass es große individuelle Unterschiede in der T-

Zellexpansion verschiedener Spender gibt. Außerdem zeigte sich, dass die Expansion in Zellkulturflaschen der Stimulierung in Beuteln überlegen ist.

Der Einfluss der Aktivierung auf die Veränderung der T-Zellsubpopulationen wurde mit Hilfe von multiparametrischen Analysen am Durchflusszytometer untersucht. Hohe IL-2 Konzentrationen (100 und 1000 U/ml) sowie die Verwendung löslicher Antikörper führten zu einer starken Zunahme der CD8⁺ T-Zellen. Der CD4/CD8 Quotient blieb lediglich unter Stimulierung mit den Beads-gekoppelten Antikörpern in Verbindung mit 20 U/ml IL-2 konstant. Mit allen Aktivierungsprotokollen ergab sich für den immunologischen Phänotyp eine Verschiebung vom naiven zum Gedächtniszelltyp. Die Proliferation CMV-spezifischer T-Zellen konnte mit allen Aktivierungsprotokollen erreicht werden und korrelierte mit der Expansionsrate der gesamten CD3⁺ T-Zellen. Die Zytokinausschüttung war verringert bei den T-Zellen, die mit den löslichen Antikörpern stimuliert wurden. Eine verminderte Zytokinproduktion könnte auf einen Verlust der Funktionalität der T-Zellen hindeuten.

Von besonderer Bedeutung ist, dass die Stimulierung über Beads-gekoppelte Antikörper zu einer gleichmäßigen Transduktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führte. Im Gegensatz dazu hatte die Aktivierung mit löslichen Antikörpern zur Folge, dass hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen transduziert wurden. Für eine kompetente Immunantwort im Rahmen einer DLI erscheint jedoch eine physiologische Zusammensetzung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen äußerst wichtig. Residuale Stammzellen könnten potentiell co-transduziert werden. Um diese Gefahr abschätzen zu können, wurden ficollisierte PBSC analog der T-Zellen expandiert. Unter allen T-Zellaktivierungsprotokollen blieben die CD34⁺ Stammzellen in den ersten Tagen der Kultur vital und durchflusszytometrisch nachweisbar. Die Stammzellen expandierten sogar geringfügig und waren damit potentiell transduzierbar - mit der Gefahr einer klonalen Entartung durch Insertionsmutagenese. Dies deutet auf die Wichtigkeit einer T-Zellselektion zur Manipulation von DLI hin, um residuale Stammzellen zu entfernen.

Die Suizidstrategie ist eine vielversprechende Möglichkeit zur Kontrolle der GVHD im Rahmen einer DLI. Voraussetzung ist aber, dass die infundierten Zellen auch immunologisch kompetent bleiben und einen GvL-Effekt bewirken. Die Aktivierung mit Beads-gekoppelten Antikörpern scheint zum Erhalt der Immunkompetenz den löslichen Antikörpern überlegen zu sein. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit müssten jedoch in einem Mausmodell überprüft werden, um die Möglichkeit eines klinischen Einsatzes abzuschätzen.

Literaturverzeichnis

Afessa B and Peters SG (2006) Major complications following hematopoietic stem cell transplantation, *Semin Respir Crit Care Med* (27) S. 297-309

Aloysius MM, Takhar A, Robins A and Eremin O (2006) Dendritic cell biology, dysfunction and immunotherapy in gastrointestinal cancers, *Surgeon* (4) S. 195-210

Andre-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, Vitetta E, Schindler J, Chedeville G, Vilmer E, Fischer A and Cavazzana-Calvo M (2002) Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study, *Lancet* (360) S. 130-7

Antin JH (2005) Approaches to graft-vs-host disease, *Pediatr Transplant* (9 Suppl 7) S. 71-5

Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D and Klingebiel T (1998) Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT, *Bone Marrow Transplant* (21) S. 487-95

Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Schrappe M, Niemeyer C, Von Stackelberg A, Gruhn B, Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck JF and Klingebiel T (2004) Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy?, *J Clin Oncol* (22) S. 1696-705

Barnes DW and Loutit JF (2001) Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow: II. 1957, *J Hematother Stem Cell Res* (10) S. 325-34

Beck O, Seidl C, Lehrnbecher T, Kreyenberg H, Schwabe D, Klingebiel T, Seifried E, Bader P and Koehl U (2006) Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci, *Eur J Haematol* (76) S. 237-44

Becker PS (2005) The current status of gene therapy in autologous transplantation, *Acta Haematol* (114) S. 188-97

Behringer D, Bertz H, Schmoor C, Berger C, Dwenger A and Finke J (1999) Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation from matched related donors with CD34+ selected PBPC grafts unselected PBPC grafts or BM grafts, *Bone Marrow Transplant* (24) S. 295-302

Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E and Dubs RW (2004) Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland, *Eur J Haematol* (72) S. 203-12

Black ME, Kokoris MS and Sabo P (2001) Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing, *Cancer Res* (61) S. 3022-6

- Bleyer WA (2002) Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials, *Med Pediatr Oncol* (38) S. 1-10
- Bondanza A, Ciceri F and Bonini C (2005) Application of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early GVL induction and later control of GVH reactions after bone-marrow transplantation, *Methods Mol Med* (109) S. 475-86
- Bondanza A, Valtolina V, Magnani Z, Ponzoni M, Fleischhauer K, Bonyhadi M, Traversari C, Sanvito F, Toma S, Radrizzani M, La Seta-Catamancio S, Ciceri F, Bordignon C and Bonini C (2005) Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes, *Blood* S.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C and Bordignon C (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia, *Science* (276) S. 1719-24
- Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S and Stevenson M (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (89) S. 6580-4
- Burt RK, Drobyski WR, Seregina T, Traynor A, Oyama Y, Keever-Taylor C, Stefka J, Kuzel TM, Brush M, Rodriguez J, Burns W, Tennant L and Link C (2003) Herpes simplex thymidine kinase gene-transduced donor lymphocyte infusions, *Exp Hematol* (31) S. 903-10
- Cavalieri S, Cazzaniga S, Geuna M, Magnani Z, Bordignon C, Naldini L and Bonini C (2003) Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence, *Blood* (102) S. 497-505
- Ciceri F, Bonini C, Gallo-Stampino C and Bordignon C (2005) Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation, *Cytotherapy* (7) S. 144-9
- Coebergh JW, Reedijk AM, de Vries E, Martos C, Jakab Z, Steliarova-Foucher E and Kamps WA (2006) Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project, *Eur J Cancer* (42) S. 2019-36
- Coito S, Sauce D, Duperrier A, Certoux JM, Bonyhadi M, Collette A, Kuehlcke K, Herve P, Tiberghien P, Robinet E and Ferrand C (2004) Retrovirus-mediated gene transfer in human primary T lymphocytes induces an activation- and transduction/selection-dependent TCR-B variable chain repertoire skewing of gene-modified cells, *Stem Cells Dev* (13) S. 71-81
- Contassot E, Murphy W, Angonin R, Pavy JJ, Bittencourt MC, Robinet E, Reynolds CW, Cahn JY, Herve P and Tiberghien P (1998) In vivo alloreactive potential of ex vivo-expanded primary T lymphocytes, *Transplantation* (65) S. 1365-70
- Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G, Jurgens H, Kabisch H, Reiter A, Riehm H, Gadner H and Schellong G (2005) Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials, *Leukemia* (19) S. 2030-42

Drobyski WR, Majewski D, Ozker K and Hanson G **(1998)** Ex vivo anti-CD3 antibody-activated donor T cells have a reduced ability to cause lethal murine graft-versus-host disease but retain their ability to facilitate alloengraftment, *J Immunol* (161) S. 2610-9

Dropulic B **(2005)** Genetic modification of hematopoietic cells using retroviral and lentiviral vectors: safety considerations for vector design and delivery into target cells, *Curr Hematol Rep* (4) S. 300-4

Fahey JL zitiert aus Giorgi JV et al. NR **(1992)** Manual of Clinical Laboratory Immunology (4th edition), American Society for Methodology, S. 174-81

Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, Guimaraes A and Travers PJ **(2003)** Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients, *Bone Marrow Transplant* (32) S. 1001-14

Fehse B, Kustikova OS, Li Z, Wahlers A, Bohn W, Beyer WR, Chalmers D, Tiberghien P, Kuhlcke K, Zander AR and Baum C **(2002)** A novel 'sort-suicide' fusion gene vector for T cell manipulation, *Gene Ther* (9) S. 1633-8

Ferrand C, Robinet E, Contassot E, Certoux JM, Lim A, Herve P and Tiberghien P **(2000)** Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire, *Hum Gene Ther* (11) S. 1151-64

Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA and Bortin MM **(1994)** Identical-twin bone marrow transplants for leukemia, *Ann Intern Med* (120) S. 646-52

Georges GE and Storb R **(2003)** Review of "minitransplantation": nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Int J Hematol* (77) S. 3-14

Giordano FA, Fehse B, Hotz-Wagenblatt A, Jonnakuty S, Val CD, Appelt JU, Nagy KZ, Kuehlcke K, Naundorf S, Zander AR, Zeller WJ, Ho AD, Fruehauf S and Laufs S **(2006)** Retroviral vector insertions in T-lymphocytes used for suicide gene therapy occur in gene groups with specific molecular functions, *Bone Marrow Transplant* S. 229-35

Giralt SA and Kolb HJ **(1996)** Donor lymphocyte infusions, *Curr Opin Oncol* (8) S. 96-102

Gratama JW, Naipal A, Oljans P, Zwaan FE, Verdonck LF, de Witte T, Vossen JM, Bolhuis RL, de Gast GC and Jansen J **(1984)** T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease, *Blood* (63) S. 1416-23

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A and Cavazzana-Calvo M

(2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science* (302) S. 415-9

Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L and Boeckh M (2003) Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation, *Blood* (102) S. 3060-7

Hedfors IA, Beckstrom KJ, Benati C, Bonini C and Brinchmann JE (2005) Retrovirus mediated gene transduction of human T-cell subsets, *Cancer Immunol Immunother* S. Hildinger M, Abel KL, Ostertag W and Baum C (1999) Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use, *J Virol* (73) S. 4083-9

Hoffmann P, Ermann J and Edinger M (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells in hematopoietic stem cell transplantation, *Curr Top Microbiol Immunol* (293) S. 265-85

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B and et al. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, *Blood* (75) S. 555-62

Junker K, Koehl U, Zimmerman S, Stein S, Schwabe D, Klingebiel T and Grez M (2003) Kinetics of cell death in T lymphocytes genetically modified with two novel suicide fusion genes, *Gene Ther* (10) S. 1189-97

Kaatsch et al. (2004) Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht

Kalamasz D, Long SA, Taniguchi R, Buckner JH, Berenson RJ and Bonyhadi M (2004) Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies, *J Immunother* (27) S. 405-18

Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S and Talpaz M (2000) Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* S. 90-109

Klingemann HG and Martinson J (2004) Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications, *Cytotherapy* (6) S. 15-22

Koehl U, Beck O, Esser R, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D and Seidl C (2003) Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Frankfurt experience, *Leukemia* (17) S. 232-6

Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M and Wilmanns W (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients, *Blood* (76) S. 2462-5

Kook H, Goldman F, Padley D, Giller R, Rumelhart S, Holida M, Lee N, Peters C, Comito M, Huling D and Trigg M (1996) Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children:

immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery, *Blood* (88) S. 1089-97

Lamana ML, Bueren JA, Vicario JL and Balas A **(2004)** Functional and phenotypic variations in human T cells subjected to retroviral-mediated gene transfer, *Gene Ther* (11) S. 474-82

Lan F, Zeng D, Higuchi M, Higgins JP and Strober S **(2003)** Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells, *Biol Blood Marrow Transplant* (9) S. 355-63

Lan F, Zeng D, Higuchi M, Huie P, Higgins JP and Strober S **(2001)** Predominance of NK1.1+TCR alpha beta+ or DX5+TCR alpha beta+ T cells in mice conditioned with fractionated lymphoid irradiation protects against graft-versus-host disease: "natural suppressor" cells, *J Immunol* (167) S. 2087-96

Lang P, Schumm M, Greil J, Bader P, Klingebiel T, Muller I, Feuchtinger T, Pfeiffer M, Schlegel PG, Niethammer D and Handgretinger R **(2005)** A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study, *Klin Padiatr* (217) S. 334-8

Laport GG, Levine BL, Stadtmauer EA, Schuster SJ, Luger SM, Grupp S, Bunin N, Strobl FJ, Cotte J, Zheng Z, Gregson B, Rivers P, Vonderheide RH, Liebowitz DN, Porter DL and June CH **(2003)** Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34+-selected hematopoietic cell transplantation, *Blood* (102) S. 2004-13

Liebowitz DN, Lee KP and June CH **(1998)** Costimulatory approaches to adoptive immunotherapy, *Curr Opin Oncol* (10) S. 533-41

Lightfoot T **(2005)** Aetiology of childhood leukemia, *Bioelectromagnetics* (Suppl 7) S. S5-S11

Link CJ, Jr., Burt RK, Traynor AE, Drobyski WR, Seregina T, Levy JP, Gordon L, Rosen ST, Burns WH, Camitta B, Casper J, Horowitz M, Juckett M, Lawton C, Margolis D, Pietryga D, Rowlings P, Taylor C, Furtado M, Stefka J, Gupta-Burt S, Kaiser H and Vesole DH **(1998)** Adoptive immunotherapy for leukemia: donor lymphocytes transduced with the herpes simplex thymidine kinase gene for remission induction. HGTRI 0103, *Hum Gene Ther* (9) S. 115-34

Link CJ, Jr., Traynor A, Seregina T and Burt RK **(1999)** Adoptive immunotherapy for leukemia: donor lymphocytes transduced with the herpes simplex thymidine kinase gene, *Cancer Treat Res* (101) S. 369-75

Lion T, Kovar H zitiert aus Gutjahr P **(2004)** Krebs bei Kindern und Jugendlichen, Deutscher Ärzte-Verlag, S. 38

List AF, Greco FA and Vogler LB **(1987)** Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus, *J Clin Oncol* (5) S. 1673-89

- Loser K and Beissert S **(2006)** Therapeutic modulation of cutaneous autoimmunity by regulatory T cells, *Rheumatology (Oxford)* (45 Suppl 3) S. iii20-iii22
- Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, Laport GG, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Hoppe RT, Bloch DA, Blume KG, Negrin RS and Strober S **(2005)** Protective conditioning for acute graft-versus-host disease, *N Engl J Med* (353) S. 1321-31
- Marijt WA and Falkenburg JH **(2001)** Specific T cell therapy in leukemia, *J Hematother Stem Cell Res* (10) S. 493-500
- Marktel S, Magnani Z, Ciceri F, Cazzaniga S, Riddell SR, Traversari C, Bordignon C and Bonini C **(2003)** Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation, *Blood* (101) S. 1290-8
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA and et al. **(1991)** T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia, *Blood* (78) S. 2120-30
- Marsh SG **(2003)** HLA nomenclature and the IMGT/HLA sequence database, *Novartis Found Symp* (254) S. 165-73; discussion 173-6, 216-22, 250-2
- Miellot A, Zhu R, Diem S, Boissier MC, Herbelin A and Bessis N **(2005)** Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway, *Eur J Immunol* (35) S. 3704-13
- Moore TB and Sakamoto KM **(2005)** Topics in pediatric leukemia--hematopoietic stem cell transplantation, *MedGenMed* (7) S. 19
- Morris KV **(2005)** VRX-496(VIRxSYS), *Curr Opin Investig Drugs* (6) S. 209-15
- Novelli F, Di Pierro F, Francia di Celle P, Bertini S, Affaticati P, Garotta G and Forni G **(1994)** Environmental signals influencing expression of the IFN-gamma receptor on human T cells control whether IFN-gamma promotes proliferation or apoptosis, *J Immunol* (152) S. 496-504
- Orchard PJ, Blazar BR, Burger S, Levine B, Basso L, Nelson DM, Gordon K, McIvor RS, Wagner JE and Miller JS **(2002)** Clinical-scale selection of anti-CD3/CD28-activated T cells after transduction with a retroviral vector expressing herpes simplex virus thymidine kinase and truncated nerve growth factor receptor, *Hum Gene Ther* (13) S. 979-88
- Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L and Tichelli A **(2005)** Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* (35) S. 637-43
- Porter DL, Levine BL, Bunin N, Stadtmauer EA, Luger SM, Goldstein S, Loren A, Phillips J, Nasta S, Perl A, Schuster S, Tsai D, Sohal A, Veloso E, Emerson SG and June CH **(2006)** A phase I trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex-vivo via CD3/CD28 co-stimulation, *Blood* S. 1325-31

Powles R, Singhal S, Treleaven J, Kulkarni S, Horton C and Mehta J **(1998)** Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery early after transplantation, *Blood* (91) S. 3481-6

Qasim W, King D, Buddle J, Verfuert S, Kinnon C, Thrasher AJ and Gaspar HB **(2003)** The impact of retroviral suicide gene transduction procedures on T cells, *Br J Haematol* (123) S. 712-9

Robinet E, Fehse B, Ebeling S, Sauce D, Ferrand C and Tiberghien P **(2005)** Improving the ex vivo retroviral-mediated suicide-gene transfer process in T lymphocytes to preserve immune function, *Cytotherapy* (7) S. 150-7

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF and Velardi A **(2002)** Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science* (295) S. 2097-100

Sanchez J, Serrano J, Gomez P, Martinez F, Martin C, Madero L, Herrera C, Garcia JM, Casano J and Torres A **(2002)** Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation, *Br J Haematol* (116) S. 686-94

Sauce D, Bodinier M, Garin M, Petracca B, Tonnelier N, Duperrier A, Melo JV, Apperley JF, Ferrand C, Herve P, Lang F, Tiberghien P and Robinet E **(2002)** Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms, *Blood* (99) S. 1165-73

Sauce D, Rufer N, Mercier P, Bodinier M, Remy-Martin JP, Duperrier A, Ferrand C, Herve P, Romero P, Lang F, Tiberghien P and Robinet E **(2003)** Retrovirus-mediated gene transfer in polyclonal T cells results in lower apoptosis and enhanced ex vivo cell expansion of CMV-reactive CD8 T cells as compared with EBV-reactive CD8 T cells, *Blood* (102) S. 1241-8

Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, Petracca B, de Carvalho Bittencourt M, Saadi M, Saas P, Ferrand C, Herve P, Tiberghien P and Robinet E **(2002)** Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions, *J Hematother Stem Cell Res* (11) S. 929-40

Seggewiss R and Dunbar CE **(2005)** A new direction for gene therapy: intrathymic T cell-specific lentiviral gene transfer, *J Clin Invest* (115) S. 2064-7

Seidel MG, Fritsch G, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Lion T, Potschger U, Rosenmayr A, Fischer G, Gadner H and Peters C **(2005)** In vitro and in vivo T-cell depletion with myeloablative or reduced-intensity conditioning in pediatric hematopoietic stem cell transplantation, *Haematologica* (90) S. 1405-14

Serafini M, Manganini M, Borleri G, Bonamino M, Imberti L, Biondi A, Golay J, Rambaldi A and Intron A **(2004)** Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease, *Hum Gene Ther* (15) S. 63-76

Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazaki H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gondo H, Morishima Y and Kodera Y **(2001)** Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: indications and dose escalation, *Ther Apher* (5) S. 40-5

Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ and Emerson SG **(1999)** Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells, *Science* (285) S. 412-5

Shortman K and Liu YJ **(2002)** Mouse and human dendritic cell subtypes, *Nat Rev Immunol* (2) S. 151-61

Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbar C and Or R **(1996)** Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* (87) S. 2195-204

Spink J and Geddes D **(2004)** Gene therapy progress and prospects: bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment, *Gene Ther* (11) S. 1611-6

Thomas CE, Ehrhardt A and Kay MA **(2003)** Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nat Rev Genet* (4) S. 346-58

Thomis DC, Marktel S, Bonini C, Traversari C, Gilman M, Bordignon C and Clackson T **(2001)** A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease, *Blood* (97) S. 1249-57

Tiberghien P **(2001)** Use of suicide gene-expressing donor T-cells to control alloreactivity after haematopoietic stem cell transplantation, *J Intern Med* (249) S. 369-77

Tiberghien P, Cahn JY, Brion A, Deconinck E, Racadot E, Herve P, Milpied N, Lioure B, Gluckman E, Bordignon P, Jacob W, Chiang Y, Marcus S, Reynolds C and Longo D **(1997)** Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study, *Hum Gene Ther* (8) S. 615-24

Tiberghien P, Ferrand C, Lioure B, Milpied N, Angonin R, Deconinck E, Certoux JM, Robinet E, Saas P, Petracca B, Juttner C, Reynolds CW, Longo DL, Herve P and Cahn JY **(2001)** Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft, *Blood* (97) S. 63-72

Trickett A and Kwan YL **(2003)** T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *J Immunol Methods* (275) S. 251-5

van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR, Weijer K, Spits H, Storm G, van Bloois L, Rijkers G, Martens AC and Ebeling SB **(2003)** A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2-/- gammac-/- double-mutant mice, *Blood* (102) S. 2522-31

van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, Dinkelaar W, Claas EC, Jol-van der Zijde CM and Vossen JM **(2005)** Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery, *Bone Marrow Transplant* (36) S. 39-50

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L and Vivier E **(2005)** Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force", *Blood* (106) S. 2252-8

Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJ, Katz FE, Healy LE, Altass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R and et al. **(1987)** Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells, *Leukemia* (1) S. 417-26

Weijtens M, van Spronsen A, Hagenbeek A, Braakman E and Martens A **(2002)** Reduced graft-versus-host disease-inducing capacity of T cells after activation, culturing, and magnetic cell sorting selection in an allogeneic bone marrow transplantation model in rats, *Hum Gene Ther* (13) S. 187-98

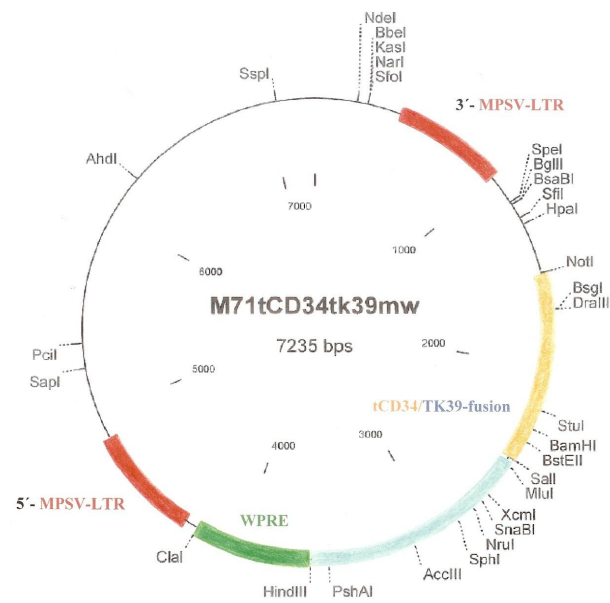
Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, Lan F, Garcia-Ojeda M, Sibley R and Strober S **(1999)** Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease, *J Exp Med* (189) S. 1073-81

Zimmermann SY, Esser R, Rohrbach E, Klingebiel T and Koehl U **(2005)** A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells, *J Immunol Methods* (296) S. 63-76

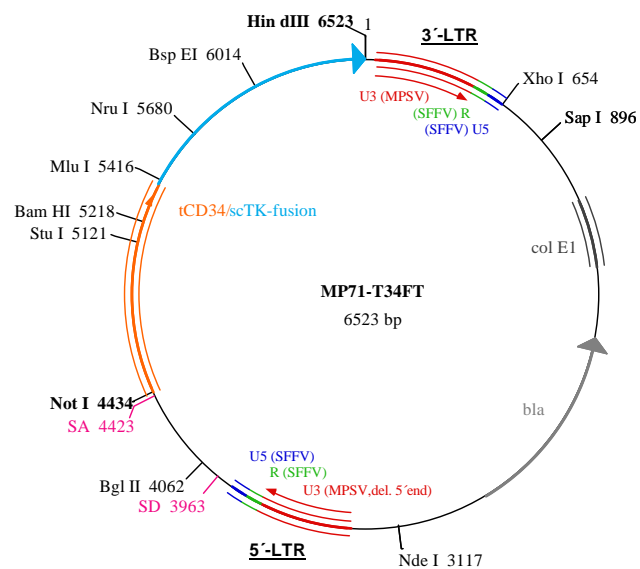
Anhang

Retrovirale Vektoren

CD34/HSV-TK Fusionsvektor (Junker, *et al.* 2003)



CD34/HSV-TK Fusionsvektor (Fehse, *et al.* 2002)



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik III der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Klingebiel und der Arbeitsgruppe Dr. Manuel Grez am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main angefertigt.

Ich möchte mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Jörg Kreuter für die freundliche Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main. Er stand mir immer mit schnellem Rat und großzügiger Hilfe zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Thomas Klingebiel für die Möglichkeit unter ihm am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt am Main promovieren zu dürfen. Außerdem möchte ich mich für die immer freundliche Unterstützung, die guten und angenehmen Arbeitsbedingungen sowie für die Zusammenarbeit beim Reisenburg Meeting Report bedanken.

Herrn Dr. Manuel Grez für die fachliche Beratung bei Fragen zu den Themen Gentechnik und Virologie.

Frau Dr. Ulrike Köhl für die sehr engagierte Betreuung, die exzellente fachliche Beratung und für die wunderbare Zusammenarbeit. Ihre Kompetenz gepaart mit Herzlichkeit verleihen Frau Dr. Köhl einen besonderen Stellenwert für mich und diese Arbeit in jeder Hinsicht.

Frau Regine Quaritsch für die schöne Zusammenarbeit und die große praktische Hilfe. Ihre wissenschaftliche Neugier und bemerkenswerte Aufmerksamkeit führten zu sehr fruchtbaren Diskussionen. Außerdem möchte ich mich für die mentale Unterstützung bedanken.

Allen Beschäftigten im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapie für die hoch qualitative praktische und fachliche Hilfe.

Allen meinen Freunden, meiner Mutter, meiner Schwester und meiner Tante Renate für die aufmunternden Worte. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Ferdinand, der alle Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit ertragen musste. Ein großes Dankeschön an meine Freundin Christine, die sich als Fachfremde mit dieser Arbeit zum Korrekturlesen auseinandergesetzt hat.

Dr. Klaus Kühlcke von der Firma EUFETS für die GMP-konforme Herstellung und kostenlose Bereitstellung der Virusüberstände zur Transduktion mit dem HSV-TK/CD34 Vektor.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch der Stiftung „Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V.“, ohne deren finanzielle Unterstützung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank auch an Frau von Haselberg und Frau Hehlert, die sich so aufopferungsvoll für die Stiftung und den Verein einsetzen.

Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Gabriele Hollatz
Geboren am 28. Februar 1977 in Bremen
ledig



Promotion

Seit 11/2003
an der J.W. Goethe Universität Frankfurt,
Institut für Pharmazeutische Technologie
Arbeitsgruppe **Prof. Dr. Jörg Kreuter** und
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Klinik III
Direktor: **Prof. Dr. Thomas Klingebiel**
im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapie
Laborleiterin: **Dr. Ulrike Köhl**
In Kooperation mit dem Georg Speyer Haus, Frankfurt
Virologie: **Dr. Manuel Grez**

Hochschulausbildung

07/2004	Approbation als Apothekerin
05/2003 – 11/2003	Pharmaziepraktikum in der öffentlichen Apotheke, Frankfurt/M
03/1999 – 04/2003	Studium der Pharmazie an der J.W. Goethe Universität, Frankfurt/M
10/1996 – 05/1998	Studium der Politikwissenschaft an der Bertolt Brecht Universität, Augsburg

Schulische Ausbildung

1994 – 1996	Schulzentrum Huchting - Gymnasiale Oberstufe, Bremen
1993 – 1994	Runton & Sutherland School (Internat), Cromer, Norfolk, England, GB
1989 – 1994	KGS Brinkum – Gymnasialzweig
1987 – 1989	KGS Brinkum – Orientierungsstufe
1983 – 1987	Grundschule Seckenhausen

Publikationen

- 2007 Hollatz G, Grez M, Mastaglio S, Quaritsch R, Huenecke S, Ciceri F, Esser R, Klingebiel T, Kreuter J, Koehl U **(2007)** T cells for suicide gene therapy: Activation, functionality and clinical relevance, *J Immunol Methods* (submitted)
- 2006 Klingebiel T, Bader P, Hollatz G, Koehl U, Lehrnbecher T, Meisel R, Dilloo D **(2006)** Immunotherapy in children: report from Reisensburg-Symposium October 20-22, 2004 and recent advances, *Klinische Pädiatrie* Nov-Dez; 218(6) S. 355-6
- 2006 Koehl U, Hollatz G, Rohrbach E, Visschedyk K, Cinatl J, Kornhuber B, Kreuter J, Mutschler E, Schwabe D **(2006)** Pharmacology of intracellular cytosine-arabinoside-5'-triphosphate in malignant cells of pediatric patients with initial or relapsed leukemia and in normal lymphocytes, *Cancer Chemother Pharmacol.* (14. Dez. Epub ahead of print)

Kongressbeiträge

Hollatz G, Grez M, Junker K, Wehner S, Quaritsch R, Brinkmann A, Klingebiel T, Koehl U **(2005)** Improvement of DLI safety in pediatric leukemia patients with two retroviral suicide genes, *Immuntherapie Kongress der Kind-Philipp-Stiftung*, Wilsede

Hollatz G, Koehl U, Klingebiel T, Grez M **(2004)** Improvement of DLI safety in pediatric patients by co-transduction of T cell with two different suicide genes, *Kongress der European Society of Gene Therapy (EGST)*, Tampere, Finland